Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

TRÄGERFIXIERUNG EINES LÖSLICHEN OSTEOGENEN FAKTORS AUS KNOCHENGEWEBE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL LEHMANN
aus Pinneberg
1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0123

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

TRÄGERFIXIERUNG EINES LÖSLICHEN OSTEOGENEN FAKTORS AUS KNOCHENGEWEBE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL LEHMANN
aus Pinneberg
1986

Dekan: Professor Dr. W. Schulte

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K. H. Schmidt

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. B. Ranke

Meinem Doktorvater,
Herrn Professor Dr. Dr. K. Schmidt,
möchte ich an dieser Stelle für die stets freundliche Unterstützung und vielfache Anregung bei der Durchführung dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	6
1.1.	Geschichtliches	6
1.2.	Problemstellung	7
1.3.	Zielsetzung	7
2.	MATERIAL	11
2.1.	Verwendete Geräte	11
2.2.	Verwendete Reagentien	12
3.	METHODEN	13
3.1.1.	Isolierung eines osteoinduktiven Faktors aus Rinderknochen - Salzsäure-Entkalkung	13
3.1.2.	Isolierung eines osteoinduktiven Faktors aus Rinderknochen - Essigsäure-Entkalkung	14
3.2.1.1.	Faktorisolierung mit Kollagenase - Maximalabbau	15
3.2.1.2.	Faktorisolierung mit Kollagenase - verkürzter Abbau	15
3.2.2.	Säulenchromatographische Auftrennung	15
3.3.	Versuchstierhaltung	16
3.4.	Aufarbeitung und Beladung der benutzten Träger	17
3.4.1.	Marbagelan	17
3.4.2.1.	Gelastypt mit aktiver Substanz	17
3.4.2.2.	Gelastypt - Leerwerte	18
3.4.3.	Sephadex G 25 in Gelatinekapseln	18
3.4.4.1.	Fibrinkleber - Beladung mit aktiver Substanz (1. Ansatz)	18
3.4.4.2.	Fibrinkleber - Beladung mit aktiver Substanz (2. Ansatz)	19

		Seite
3.4.4.3.	Fibrinkleber - Leerwerte	19
3.4.5.1.	Ethibloc Okklusionsgel - beladen mit aktiver Substanz (1. Ansatz)	19
3.4.5.2.	Ethibloc Okklusionsgel - beladen mit aktiver Substanz (2. Ansatz)	20
3.4.5.3.	Ethibloc Okklusionsgel - Leerwerte	20
3.4.6.1.	Kollagen - beladen mit aktiver Substanz (1. Ansatz)	20
3.4.6.2.	Kollagen - beladen mit aktiver Substanz (2. Ansatz)	21
3.4.6.3.	Kollagen - beladen mit aktiver Substanz (3. Ansatz)	21
3.4.6.4.	Kollagen - Leerwerte	22
3.4.7.1.	Alzet Mikropumpen 2002	22
3.4.7.2.	Alzet Mikropumpen 2ML4	23
3.5.1.	Narkose der Tiere	24
3.5.2.	Implantationstechnik: Gelastypt, Marbagelan, Sephadex-Gelatinekapseln, Fibrinkleber, Ethibloc-Okklusionsgel	24
3.5.3.	Implantationstechnik: Kollagen	25
3.5.4.	Implantationstechnik: Alzet Mikropumpen 2002	25
3.5.5.1.	Implantationstechnik: Alzet Mikropumpen 2ML4 - ohne Gelastypt -	25
3.5.5.2.	Implantationstechnik: Alzet Mikropumpen 2ML4 - mit Gelastypt -	26
3.6.	Explantationstechnik	26
3.7.	Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase	27
3.7.1.	Aufarbeitung der Explantate zur Messung der alkalischen Phosphatase	27
3.7.2.	Meßprinzip der alkalischen Phosphatase	27
3.7.3.	Messung der AP-Aktivität	27
3.7.4.	Berechnung der AP-Aktivität	28

		Seite
3.8.	Histologie	29
3.9.	Anfertigung der Mikrofotografien	29
4.	ERGEBNISSE	30
4.1.	Marbagelan	30
4.2.	Sephadex G 25	30
4.3.1.	Kollagen, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung	31
4.3.2.	Kollagen, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung	32
4.3.3.	Kollagen - Leerwerte	33
4.3.4.	Kollagen, beladen mit Lyophilisat der Essigsäure-Entkalkung	33
4.3.5.	Beurteilung von Kollagen als Trägersubstanz	35
4.4.1.	Fibrinkleber, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung	36
4.4.2.	Fibrinkleber, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung	37
4.4.3.	Fibrinkleber - Leerwerte	38
4.4.4.	Beurteilung von Fibrinkleber als Trägersubstanz	38
4.5.1.	Ethibloc Okklusionsgel, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung	39
4.5.2.	Ethibloc Okklusionsgel, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung	40
4.5.3.	Ethibloc Okklusionsgel - Leerwerte	41
4.5.4.	Beurteilung von Ethibloc Okklusionsgel als Trägersubstanz	41
4.6.1.	Gelastypt, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung	42
4.6.2.	Gelastypt, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung	43

		Seite
4.6.3.	Gelastypt - Leerwerte	47
4.6.4.	Beurteilung von Gelastypt als Trägersubstanz	47
4.7.1.	Alzet Mikropumpen 2002, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung	49
4.7.2.	Alzet Mikropumpen 2002, beladen mit Lyophilisat des verkürzten Kollagenase-Abbaus	49
4.7.3.	Beurteilung der Alzet Mikropumpen 2002	50
4.8.1.	Alzet Mikropumpen 2ML4, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung	50
4.8.2.	Beurteilung der Alzet Mikropumpen 2ML4	51
5.	DISKUSSION	53
6.	ZUSAMMENFASSUNG	62
7.	LITERATURVERZEICHNIS	63

Abkürzungen

abd.	abdominis
AP	alkalische Phosphatase
BIP	bone induction principle
BMP	bone morphogenetic protein
g	Gravitationskonstante
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	intraperitoneal
KIE	Kallidinogenase-Inaktivator-Einheit = $1{,}111 \times 10^{-3}$ Trypsin-Inhibitor-Einheiten
M.	musculus
Mm.	musculi
NIH	Internationale Einheit für humanes Thrombin
p.a.	pro analysi, höchste erhältliche Reinheitsstufe
r=av	mittlerer Radius
r=max	maximaler Radius
sup.	superior
U	Unit, Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumen pro Volumen

1. EINLEITUNG

1.1. Geschichtliches

Erste Theorien über die Knochenheilung nach Frakturen existieren bereits seit Jahrzehnten, zurückreichend bis an die Jahrhundertwende.

Bei der Osteoblastentheorie werden als Quelle der Knochenneubildung die Osteoblasten aus Periost und Knochenmark des Implantates angesehen (Axhausen, 1909; Lexer, 1924).

Die metaplastische Theorie besagt, daß undifferenzierte Bindegewebszellen durch einen osteogenen Stimulus in Knochenzellen umgewandelt werden. Dieses erstmals von Barth (1893) aufgestellte Postulat wurde von Baschkirzew und Petrow (1912) als die "metaplastische Theorie der Knochenbildung" formuliert. Sie untermauerten ihre Theorie durch Implantation von periostfreiem Knochen in Kaninchenmuskel, aus dem sie nach sechs Tagen ein osteoides Gewebe explantieren konnten.

Diese Substanz, die einen osteogenen Stimulus auf Bindegewebszellen überträgt, wurde von Gallie et al (1920) als "Osteogenin" bezeichnet. Levander (1938) bestärkte das Vorhandensein dieses Osteogenins, indem er durch unentkalkt implantierten Knochen eine Knochenneubildung, die vom Bindegewebe des Empfängers ausging, zeigen konnte.

In den folgenden Jahren führte das zur Postulierung eines Induktionsfaktors, der Wirtszellen zur Knochenbildung durch das Transplantat anregt (Urist und McLean, 1952). Dieser Induktionsfaktor greift an einer "osteoprogenitor cell" an (Young, 1962), die aus Mesenchymzellen hervorgeht (Kember, 1960).

Putte und Urist (1965) und Urist et al (1967) isolierten das sogenannte "bone morphogenetic protein" (BMP), das durch Entkalkung des Knochens mit 0,6 n Salzsäure und abschließende Abtrennung des Kollagens erhalten wird. Durch die Einwirkung von Kollagenase auf Knochengelatine geht BMP in Lösung (Urist et al, 1979). Die Forscher konnten zeigen, daß das BMP einen deutlichen osteoinduktiven Effekt auslösen kann. BMP ist für die Modulation und Differenzierung von Mesenchymzellen des Muskels zu Knochen und Knochenmarkszellen verantwortlich (Urist und Strates, 1971).

1.2. Problemstellung

Weitere Isolierungsverfahren (Herr, Lit. Nr. 27) führten zu löslichen Substanzen, denen eine osteogene Potenz im Sinne der metaplastischen Theorie unterstellt wurde. Diese Substanzen können weder in gelöster Form noch als Lyophilisat implantiert werden, da sie in diesem Fall sofort auf dem Blutweg fortgeschwemmt werden würden, ohne eine Osteoinduktion auszulösen. Dieses führte zu der Forderung nach einem Träger, an den diese Substanzen adsorbiert werden können. Nach Implantation im Tiermuskel sollen sie dann durch langsame Freisetzung aus diesem Träger zu einer Osteoinduktion führen. Der Träger selbst sollte dabei metabolisiert werden, ohne einen eigenen osteogenen Effekt auszulösen.

1.3. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, einen Träger mit den in 1.2. angegebenen Voraussetzungen zu finden und auszutesten. Das Hauptproblem bestand dabei in der Beurteilung

der Ergebnisse; denn bei den benutzten Substanzen, mit denen die Träger beladen wurden, konnte nie mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß diese Substanzen auch osteogen wirksam waren. Ein negatives Ergebnis, bei dem der Träger aufgelöst ist und auch kein Zeichen einer Ossifizierung zu finden ist, bedeutet also nicht gleich, daß der Träger seine Funktion nicht erfüllt hat - es kann auch an der Inaktivität der aufgeladenen Substanz gelegen haben. Das einzig sichere Ergebnis ist das Positive: Vollständige Metabolisierung des Trägers bei gleichzeitiger eindeutiger Ossifizierung.

Um die gesetzten Ziele zu erreichen, wurden folgende Substanzen als Träger ausgetestet:

- Marbagelan und Gelastypt sind Schaummaterialien aus Gelatine. Ihr Hauptanwendungsgebiet liegt in der Zahnheilkunde bei der Füllung von Extraktionshöhlen. Sie werden dort von Kapillaren durchwachsen und schließlich vollständig metabolisiert (Streckbein und Lorber, 1978). Diese Metabolisierung und gute Saugfähigkeit der Schwämmchen ließen sie als Träger geeignet erscheinen.

- Fibrinkleber Tissucol wird aus gepooltem Plasma von menschlichen Spendern gewonnen. Zusammen mit einem Applikationsset wird es in der Chirurgie zu Klebungen aller Arten von Geweben verwendet.

Da es sich hier um rein humane Proteine handelt, ist anzunehmen, daß sie für die Ratte nicht toxisch sind und gut metabolisiert werden können. Dadurch sollte es auch zu einer Freisetzung von adsorbierten oder eingeschlossenen Substanzen kommen, so daß Fibrinkleber als Träger geeignet erscheint.

- Ethibloc Okklusionsgel wird zur präoperativen

Gefäßembolisation bei renalen Geschwülsten und zur Füllung von Pankreasgängen verwendet. Nach Angabe der Gebrauchsinformation wird das Okklusionsgel nach 10 Tagen bis 4 Wochen resorbiert, so daß es als potentieller Träger für diese Versuche in Frage kommt.

- Sephadex G 25 wurde hier versucht, um überhaupt eine Aktivität der aufgeladenen Substanzen festzustellen. Eine Diffusion der osteogenen Substanz in die Sephadexkügelchen hinein und - nach Implantation - auch wieder hinaus, ist denkbar. Eine Resorption des Trägers konnte selbstverständlich nicht erwartet werden.

- Kollagen, als tierisches Protein, erfüllt auf jeden Fall die Voraussetzung der guten Metabolisierung. Um osteoinduktive Substanz an das Kollagen zu adsorbieren, wurde dieses gelöst und aufgekocht, um eine teilweise Öffnung der Tripelhelix zu erreichen. Mit dem Abkühlen und wieder Ausfallen des Kollagens wurde ein Einschluß der osteogenen Substanz in die regenerierende Helix erhofft. Auch andere Bindungen der als Protein identifizierten osteoinduktiven Substanz, wie z.B. interchenare Brücken, wären denkbar. Durch die Metabolisierung des Kollagens sollte die aktive Substanz dann freigesetzt werden.

- Mikropumpen wurden verwendet, um eine nahezu trägerfreie Applikation der osteogenen Substanz zu erreichen. Die in Ampuwa gelöste Substanz wurde damit in ein bzw. vier Wochen zwischen die Rattenmuskeln gepumpt.

Die Sterilität der Implantate konnte relativ leicht gewährleistet werden, da die Träger zum Teil schon steril bezogen werden konnten. Eine spezielle Sterilisierung der Träger mit Beladung wurde nicht durchgeführt. Nur bei der

Implantation der größeren 2ML4-Pumpen wurden die Tiere ventral und dorsal mit Merfen desinfiziert.

Die Bewertung von osteoinduktiver Substanz und Träger erfolgte einerseits durch die Messung der alkalischen Phosphatase (als Osteoblastenenzym) und andererseits histologisch. Die von den Explantaten angefertigten Schnitte wurden nach Masson-Goldner gefärbt, um einen Überblick über die vorhandenen Strukturen zu erhalten, und nach Kossa, um eine entstandene Verkalkung durch eine Schwarzfärbung zu erkennen.

2. MATERIAL

Die hier mit ^{R} gekennzeichneten Geräte und Substanzen bezeichnen registrierte Warennamen. Im Folgenden dieser Arbeit wird auf diese Kennzeichnung verzichtet.

2.1. Verwendete Geräte

Zentrifuge J2-21 mit Rotor JA 14 (Beckmann, München)
Zentrifuge TJ-6 (Beckmann, München)
Zentrifuge IV KS (Heraeus Christ, Osterode/Harz)
Waage P 1210 (Mettler, Gießen)
Magnetrührer (Bachofer, Reutlingen)
Messerhomogenisator (Bühler, Tübingen)
Lyophilisator Beta I (Christ, Osterode/Harz)
Exsikkator (Bachofer, Reutlingen)
Rotationsverdampfer Rotavapor RE (Büchl, Schweiz)
Photomikroskop Zeiss Universal (Zeiss, Oberkochen)
Alzet^{R} Mikropumpen 2002 und 2ML4 (Alza Corp., USA, Cal.)
Duplojekt^{R} Applikationssystem (Immuno AG, Wien, Österreich)
Spektralphotometer PM 4 mit Goerz-Potentiometerschreiber (Zeiss, Oberkochen)
LKB-Detektor 2089 Uvicord III (Bromma, Schweden)
LKB-Fraktionssammler 2138 Uvicord S (Bromma, Schweden)
Mehrfachschreiber (Colora, Lorch)
Peristaltic-Pump P3 (Pharmacia, Schweden)

2.2. Verwendete Reagentien

Marbagelan^{R} (Behringwerke AG, Marburg)
Gelastypt^{R} M 1/2 (Hoechst, Frankfurt/Main)
Sephadex^{R} G 25 (Pharmacia, Schweden)
Alkalische Phosphatase Test-Kit (Merck, Darmstadt)
Fibrinkleber Tissucol^{R} (Immuno, Heidelberg)
Ethibloc^{R} Okklusionsgel-Applikationsset (Ethicon, Norderstedt)
Amberlite^{R} Ionenaustauscher MB 2 (Serva, Heidelberg)
Isotone Kochsalzlösung (Braun, Melsungen)
Triton-X-100 (Serva, Heidelberg)
Salzsäure, 25% (Merck, Darmstadt)
Chloroform, techn. rein (Merck, Darmstadt)
Methanol, techn. rein (Merck, Darmstadt)
Nembutal^{R} (Abbott, Ingelheim)
Ampuwa^{R} (Fresenius, Bad Homburg)
Merfen^{R} (Zyma, München)

Alle weiteren, hier nicht einzeln aufgeführte Chemikalien waren Produkte der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten erhältlichen Form.

3. METHODEN

3.1.1. Isolierung des osteoinduktiven Faktors aus Rinderknochen - Salzsäure-Entkalkung

Ausgangsmaterial: 13 kg Rinderknochen vom Tübinger Schlachthof, vorwiegend Radius, Ulna, Tibia und Fibula.

Die Kondylen der Knochen wurden knapp abgesägt, sowie anhängende Fleischreste und das Periost mit einem Messer entfernt. Die Knochen wurden mit Hilfe eines Schraubstockes zerknackt und das Knochenmark so gut wie möglich abgekratzt. Zum weiteren Entfetten wurden die Knochenstücke in ein $CHCl_3/CH_3OH$-Gemisch (1:1, v/v) eingelegt. Das Lösungsmittel wurde zwei Mal gewechselt.

Die luftgetrockneten und in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Knochen fräste die Fa. Schuster (Ammerbuch-Reusten) in 1-2 mm kleine Späne. Durch den sehr hohen Verlust beim Fräsen verblieben noch 730 g Knochenspäne. Diese Späne wurden nach nochmaligem Entfetten in $CHCl_3/CH_3OH$ mit 1800 ml 0,6 n Salzsäure in 3 Fraktionen entkalkt. Zur vollständigen Entkalkung wurde stündlich mit dem Glasstab gerührt. Die Knochenspäne wurden durch Zentrifugation im JA 14 Rotor der Beckmann-Zentrifuge bei 4000 Upm $\hat{=}$ 2460 xg (r=max) von der Salzsäure getrennt. Die Knochenspäne wurden zur weiteren Verwendung eingefroren.

Der Überstand der Zentrifugation, 1860 ml verdünnte Salzsäure, wurde mit 0,1 n Natronlauge auf pH 7,0 titriert. Diese Lösung wurde mit einem Mischbettionenaustauscher (Amberlite MB 2) im Batch-Verfahren deionisiert. Nach Lyophilisation ergab sich eine Ausbeute von 1,212 g Lyophilisat.

3.1.2. Isolierung des osteoinduktiven Faktors aus Rinderknochen - Essigsäure-Entkalkung

Ausgangsmaterial: 9 kg Rinderknochen vom Tübinger Schlachthof, vorwiegend Radius, Ulna, Tibia und Fibula.

Die Isolierung wurde wie in 3.1.1. durchgeführt, jedoch wurden die Knochen mit großzügig abgesägten Kondylen zum Fräsen gegeben. Durch die Größe und damit bessere Handlichkeit verringerte sich der Verlust beim Fräsen auf ein Minimum. Es wurden 980 g entfettete Späne gewonnen.

50 g der so erhaltenen Knochenspäne wurden mit 300 ml 0,6 n Essigsäure versetzt und bei 4 °C 20 h gerührt. Das Gemisch wurde in der Christ-Zentrifuge 15 Min. mit 3500 Upm ≙ 1900 xg (r=av) zentrifugiert, der Niederschlag verworfen und der Überstand mit 200 mg löslichem Kollagen (Serva) und 10 ml 25%iger Salzsäure bei 4 °C drei Tage gerührt. Nach anschließender Zentrifugation, 20 Min., 3500 Upm ≙ 1900 xg (r=av), bei 4 °C wurde der Überstand gegen 0,02 m Na_2HPO_4-Lösung dialysiert. Bei täglichem Lösungsmittelwechsel war nach vier Tagen im Dialyseschlauch eine leichte Trübung erkennbar, das pH 9,0. Die 20-minütige Zentrifugation bei 3500 Upm ≙ 1900 xg (r=av) ergab einen Niederschlag von 13,7 mg, der verworfen wurde.

Der Überstand wurde mit 9-fachem Überschuß an Aceton versetzt. Die starken Niederschläge wurden am Rotationsverdampfer einrotiert, der Rest in Aqua demin. aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 1,48 g.

3.2.1.1. Faktorisolierung mit Kollagenase - Maximalabbau

Dieses Material wurde von G. Herr freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die entkalkten, entfetteten, gewaschenen und lyophilisierten Knochen wurden durch 2100 U Kollagenase pro Gramm Knochenmatrix in 72 Stunden zum großen Teil gespalten. Der Niederschlag der anschließenden Zentrifugation wurde verworfen, der Überstand säulenchromatographisch weiter aufgetrennt und gereinigt (Herr, Lit. Nr. 27).

3.2.1.2. Faktorisolierung mit Kollagenase
- verkürzter Abbau

In einem anderen Ansatz wurde die enzymatische Spaltung der Knochenmatrix mit einer auf 24 Stunden verkürzten Kollagenase-Einwirkzeit versucht. Durch den verkürzten Abbau besteht die Hoffnung auf größere Spaltprodukte mit anderen, mehr osteoinduktiv wirkenden Eigenschaften (Herr, Lit. Nr. 27).

3.2.2. Säulenchromatographische Auftrennung

Für die Experimente mit Fibrinkleber (3.4.4.2.), Ethibloc (3.4.5.2.) und Kollagen (3.4.6.2.) wurde der Überstand der in 3.2.1.1. angegebenen Zentrifugation weiter aufgetrennt: 28 ml dieses Überstandes wurden mit 280 ml Aceton versetzt, vorsichtig aufgeschüttelt und einige Stunden stehen gelassen. Das Aceton wurde im Rotationsverdampfer abrotiert, der Niederschlag in wenig demin. H_2O aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 1,787 g Lyophilisat. Dieses wurde in einer minimalen Menge

0,02 m NH_4HCO_3-Puffer (ca. 4 ml) aufgenommen und auf eine Sephadex G 10 - Säule aufgebracht.

Daten der Säule:

Füllung:	Sephadex G 10
Gesamtgelbett:	813 ml
Ausschlußvolumen:	271 ml = 33%
Höhe:	41,5 cm
Durchmesser:	5 cm
Puffer:	0,02 NH_4HCO_3
Flußrate:	60 ml/h

Mittels Fraktionssammler wurden 124 Fraktionen à 8 ml aufgefangen.

Fraktionen:

1-25:	Vorlauf, wurde verworfen
26-53:	eingefroren, lyophilisiert und weiterverwendet (s. 3.4.), Ausbeute: 1,317 g
54-68:	Salzpeak, wurde verworfen
69-124:	eingefroren und lyophilisiert, Ausbeute: 70 mg, dann verworfen

3.3. Versuchstierhaltung

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Sprague Dawley Ratten (Gesellschaft für medizinische Versuchstierzuchten mbH, Dr. Ivanovas, Kissleg im Allgäu) mit einem Gewicht von ca. 300 g verwendet. Die Ratten wurden in Gruppen von 3 Tieren in Makrolon-Käfigen von ca. 800 cm^2 Bodenfläche gehalten. Die Raumtemperatur betrug 23-25 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55-65 %. Als Futter erhielten die Tiere Altromin^R Standarddiät (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) und Leitungswasser ad libitum.

3.4. Aufarbeitung und Beladung der benutzten Träger

Da nicht jeder der benutzten Träger auf die gleiche Art und Weise mit der osteoinduktiven Substanz beladen werden konnte, sind im folgenden die verschiedenen Aufarbeitungsmodi aufgezeigt.

3.4.1. Marbagelan

Marbagelan ist ein Gelatineschwämmchen, das in einer Größe von 85x50 mm, bei einer Dicke von etwa 2 mm, angeboten wurde. Von diesen Schwämmchen wurden Stücke von ca. 5x10 mm abgeschnitten. Nun wurde das in 3.1.1. gewonnene Lyophilisat in demineralisiertem Wasser gelöst, so daß 1 ml Lösung 200 mg des Lyophilisates enthielt. Von dieser Lösung wurden je 0,5 ml (≙ 100 mg des Lyoph.) auf je eines der zurechtgeschnittenen Schwämmchen geträufelt. Da die so flüssigkeitsgefüllten Schwämmchen zum Implantieren noch zu feucht waren, wurden sie über Nacht im Exsikkator getrocknet. Diese getrockneten Schwämmchen wurden nach 3.5.2. implantiert.

3.4.2.1. Gelastypt mit aktiver Substanz

Während der Experimente mußte von Marbagelan auf Gelastypt gewechselt werden, da Marbagelan nicht mehr erhältlich war. Gelastypt ist ein poröses Schaummaterial auf der Basis von Gelatine, das in einer Größe von 7x7x14 mm bezogen werden konnte.

Die Beladung und weitere Verarbeitung von Gelastypt erfolgte wie in 3.4.1. mit Marbagelan beschrieben, als Lösungsmittel der Substanzen wurde Ampuwa verwendet.

3.4.2.2. Gelastypt - Leerwerte

Als Leerwerte wurden die Gelastypt-Schwämmchen jeweils mit 0,5 ml Ampuwa beträufelt. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie in 3.4.1. beschrieben.

3.4.3. Sephadex G 25 in Gelatinekapseln

Die 10x5 mm messenden Gelatinekapseln wurden zur Hälfte mit trockenem Sephadex G 25 gefüllt. Darauf wurden 0,5 ml der Lösung aus 3.4.1. geträufelt und die Kapseln geschlossen. Auf Grund der Quellung des Sephadex und der sich durch die Feuchtigkeit zersetzenden Gelatinekapseln war eine sofortige Implantation (s. 3.5.2.) notwendig, da sonst eine quantitative Implantation dieser Sephadex-Gelatinekapsel-Kombination nicht mehr möglich gewesen wäre.

3.4.4.1. Fibrinkleber - Beladung mit aktiver Substanz (1. Ansatz)

Aus dem Fibrinkleber-Applikationsset (Immuno) wurden 8 NIH-Einheiten lyophilisiertes Thrombin in 6 ml Aprotinin-Kalziumchloridlösung (enthält 3000 KIH/ml Aprotinin in 40 mMol/l $CaCl_2$) gelöst. Dieser Mischung wurden 325 mg Lyophilisat aus 3.1.1. zugesetzt. Diese Gesamtmischung wurde mit 2 ml aufgetautem Tissucol-Fibrinkleber auf einer Glasplatte miteinander vermischt, so daß sich 5 Koagel bildeten. Da diese Koagel keine einheitliche Größe hatten, konnte nicht davon ausgegangen werden, daß in jedem dieser Koagel die gleiche Menge an Lyophilisat enthalten war. Die Implantation erfolgte nach 3.5.2.

3.4.4.2. Fibrinkleber - Beladung mit aktiver Substanz (2. Ansatz)

In einem anderen Ansatz wurde das nach säulenchromatographischer Auftrennung erhaltene Lyophilisat (3.2.2.) verwendet: 300 mg dieser Substanz wurden mit 8 NIH-Einheiten lyophilisiertem Thrombin in 2 ml Aprotinin-Kalziumchloridlösung (s. 3.4.4.1.) gelöst. Mittels des Duplojekt-Applikationssets (die primär getrennten Lösungen werden gleichzeitig durch eine gemeinsame Kanüle gedrückt) wurde diese Lösung zusammen mit 2 ml Tissucol-Fibrinkleber in sechs Portionen auf eine Petrischale appliziert. Nach Lufttrocknung der sich gebildeten Koagel erfolgte die Implantation nach 3.5.2.

3.4.4.3. Fibrinkleber - Leerwerte

Nach Herstellung der Aprotinin-Kalziumchlorid-Thrombin-Lösung wie in 3.4.4.1. wurde diese zusammen mit dem Tissucol-Fibrinkleber in ein Plastikröhrchen injiziert. Nach Koagulation wurde dieses Röhrchen in sechs gleich große Teile zerbrochen und die einzelnen Koagel entfernt. Diese Koagel wurden als Leerwerte implantiert (s. 3.5.2.).

3.4.5.1. Ethibloc Okklusionsgel - beladen mit aktiver Substanz (1. Ansatz)

Ethibloc Okklusionsgel, normalerweise zum Verschließen von Arterien und Pankreasgängen verwendet, ist eine sehr visköse, in einer Spritze gelieferte Substanz, die in Verbindung mit Wasser ausfällt.

Von diesem Gel wurden 2 mal 0,5 ml und 2 mal 1,0 ml in einem Reagenzglas mit je 50 mg Lyophilisat aus 3.1.1.

verrührt. Ausgefällt wurden diese Mischungen mit jeweils 0,5 ml Aqua demin. Es ergaben sich Klumpen von kaugummiartiger Konsistenz, die in den Reagenzgläsern belassen und über Nacht im Exsikkator getrocknet wurden. Sie waren am folgenden Tag erhärtet und wurden nach 3.5.2. implantiert.

3.4.5.2. Ethibloc Okklusionsgel - beladen mit aktiver Substanz (2. Ansatz)

300 mg des Lyophilisates aus 3.2.2. wurden in einer 10 ml Spritze mit 1,5 ml Ethibloc Okklusionsgel gleichmäßig vermischt. Diese Lösung wurde tropfenweise auf eine Glasplatte gegeben, so daß jeder Tropfen für sich über Nacht aushärten konnte. Ein sechstel der so erhaltenen Minikoagel wurden für ein Implantat nach 3.5.2. verwendet.

3.4.5.3. Ethibloc Okklusionsgel - Leerwerte

Je 0,5 ml des Okklusionsgels wurden mit 0,5 ml Aqua demin. ausgefällt und entsprechend 3.4.5.1. weiterverarbeitet und implantiert.

3.4.6.1. Kollagen - beladen mit aktiver Substanz (1. Ansatz)

800 mg Kollagen (Serva) wurden mit 160 ml demineralisiertem Wasser und 10 Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und eine Stunde gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in zwei gleiche Teile geteilt.

In die erste Hälfte wurden 200 mg Lyophilisat aus 3.1.1. gegeben und bis zur vollständigen Lösung vorsichtig gerührt. Zur Ausfällung der Proteine wurde die Lösung mit einem 9-fachen Überschuß an Aceton versetzt und am Rotationsverdampfer bis auf einen Rest von 50 ml einrotiert. Dieser Rest wurde eingefroren und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 580 mg, entsprechend 20 mg oder 3,33% Verlust an Kollagen mit Lyophilisat. Die so erhaltene Substanz wurde geviertelt und in 145 mg-Portionen nach 3.5.3. implantiert.

3.4.6.2. Kollagen - beladen mit aktiver Substanz (2. Ansatz)

300 mg Kollagen (Serva) wurden in 50 ml Aqua demin. mit Zusatz von 10 ml konzentrierter Essigsäure unter Erwärmen in Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen wurden 300 mg Lyophilisat nach 3.2.2. zugesetzt und eine Stunde vorsichtig gerührt. Die Lösung wurde eingefroren und lyophilisiert. Das noch leicht nach Essig riechende Lyophilisat wurde so belassen und in 6 Portionen nach 3.5.3. implantiert.

3.4.6.3. Kollagen - beladen mit aktiver Substanz (3. Ansatz)

Von dem in 3.1.2. hergestellten Lyophilisat wurden 6 Portionen nach 3.5.3. implantiert.

3.4.6.4. Kollagen - Leerwerte

Die zweite Hälfte, wie im ersten Absatz von 3.4.6.1. beschrieben, wurde, allerdings ohne aktives Lyophilisat, ebenfalls mit Aceton gefällt, einrotiert und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 229 mg, entsprechend 181 mg oder 3o,2% Verlust an Kollagen. Diese Substanz wurde ebenfalls geviertelt und nach 3.5.3. implantiert.

3.4.7.1. Alzet Mikropumpen 2002

Um eine nahezu trägerfreie Applikation der osteoinduktiven Substanz zu gewährleisten, wurde hier eine Mikropumpe mit einer Länge von 3,0 cm und einem Durchmesser von 0,7 cm verwendet. Das Prinzip dieser Pumpe beruht auf der osmotischen Druckdifferenz zwischen Pumpe und umgebendem Gewebe. Nach Herstellerangaben beträgt der einfüllbare Inhalt der Pumpen 238 µl bei einer Pumprate von 0,5 µl/h bei 37 ^{o}C. Diese Pumprate wird 6 Stunden nach der Implantation erreicht und für 2 Wochen aufrecht erhalten.

Zur Füllung der Pumpen wurden 250 mg der aus 3.2.1.1. erhaltenen Substanz in 1,2 ml Ampuwa gelöst. Mit dieser Lösung wurden, per Spritze mit Kanüle, drei Pumpen direkt gefüllt, die Füllung der beiden anderen wurde vorher durch einen Sterilfilter (45 µm) gepreßt. Jede Pumpe enthielt somit (optimale Füllung vorausgesetzt) 49,6 mg der aktiven Substanz.

In einem anderen Ansatz wurden vier Pumpen mit jeweils 50 mg des Lyophilisates aus dem verkürzten Kollagenase-Abbau (3.2.1.2.), gelöst in Ampuwa, gefüllt. Als Phosphat-Donor wurden zwei dieser Pumpen zusätzlich mit ß-Glycero-

phosphat beschickt, so daß die Konzentration in den Pumpen 0,02 m betrug.

Den Pumpen wurde der "Flow Moderator" eingesetzt, die Plastikkappen entfernt und statt dessen ein 2 cm langer Teflonschlauch aufgesteckt. Die so vorbereiteten Pumpen wurden nach 3.5.4. implantiert.

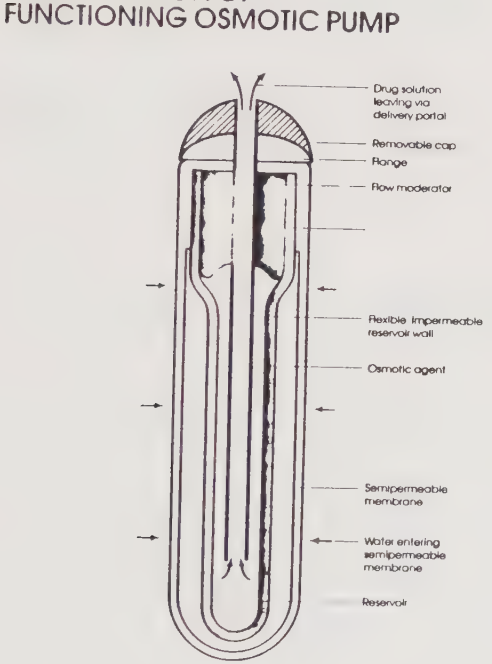

Abb. 1: Querschnitt der osmotischen Pumpen

3.4.7.2. Alzet Mikropumpen 2ML4

Die Pumpen 2ML4 sind eine größere Ausführung der in 3.4.7.1. beschriebenen. Mit einer Länge von 5,1 cm, einem Durchmesser von 1,4 cm, sind sie mit 2090 µl zu befüllen. Bei einer angegebenen Pumprate von 2,23 µl/h arbeiten sie über 4 Wochen.

Diese Pumpen wurden ebenfalls mit der aus dem Kollagenase-Abbau (3.2.1.1.) erhaltenen Substanz gefüllt, so daß jede Pumpe davon 500 mg, gelöst in Ampuwa, enthielt. Da mit diesen größeren Pumpen eine andere Implantationstechnik angewendet wurde, mußte ein 15 cm langer Schlauch anstelle der Plastikkappen aufgesteckt werden. (s. 3.5.5.1.)

3.5.1. Narkose der Tiere

Zur schmerzfreien Implantation der verschiedenen Träger wurden die Tiere mit 0,081 ml/100 g Tiergewicht Nembutal i.p. anästhetisiert. Wenn die Dosis nicht ausreichte, wurden 0,1 - 0,15 ml/Tier nachinjiziert.

3.5.2. Implantationstechnik: Gelastypt, Marbagelan, Sephadex-Gelatinekapseln, Fibrinkleber, Ethibloc Okklusionsgel

Den auf dem Rücken liegenden Tieren wurde das Fell in der Bauchregion abrasiert. Der 1 cm lange Hautschnitt erfolgte 1 cm lateral der Mittellinie und 1-2 cm caudal des Rippenbogens. An den unter der Haut liegenden Muskeln wurde der laterale Rand des M. rectus abdominis (erkenntlich an der weißen Linie der Rektusscheide) aufgesucht. 1 mm lateral dieser Linie wurde der M. obliquus abd. externus, unter Schonung des M. obliquus abd. internus, in cranial-caudaler Richtung durchschnitten. Zwischen die Mm. obliquii wurde mit dem Skalpell (stumpfe Präparation) und einem Wattebausch eine Tasche gebildet, so daß das Implantat (beladenes Marbagelan etc., s. 3.4.1.-3.4.5.) darin Platz fand. Der Muskel wurde mit 1-2, die Haut mit 2-3 Stichen verschlossen.

Jedes Tier erhielt beidseits je ein Implantat.

3.5.3. Implantationstechnik: Kollagen

Die in 3.4.6. erhaltenen lyophilisierten Kollagen-Portionen wurden in eine vorn abgeschnittene 2 ml-Spritze gefüllt und mit einem zweiten Spritzenstempel bestmöglichst komprimiert. Diese Spritze konnte in die Muskeltasche zwischen den Mm. obliquii abd. (s. 3.5.2.) eingeführt werden und das Lyophilisat auf diese Weise quantitativ untergebracht werden.

Diese Kollagenimplantationen erfolgten bei den Tieren ebenfalls beidseitig.

3.5.4. Implantationstechnik: Alzet Mikropumpen 2002

Zur Implantation der 3 cm langen Pumpen erfolgte der Hautschnitt wie in 3.5.2. beschrieben, der Muskelschnitt wurde mit ca. 2 mm Länge minimal gehalten. Durch den Hautschnitt wurde nach kranial eine subkutane Tasche gebildet, in der die Pumpe Platz fand. Die Schlauchspitze der Pumpe wurde in die gebildete Muskeltasche zwischen den Mm. obliquii abd. eingeführt, so daß der Schlauch 1-1,5 cm in diese Tasche hineinragte. Mit dem Vernähen der Muskelläsion wurde gleichzeitig der in die Muskeltasche führende Schlauch fixiert. Pro Tier wurde eine Pumpe implantiert.

3.5.5.1. Implantationstechnik: Alzet Mikropumpen 2ML4 - ohne Gelastypt -

Auf Grund der Größe der Alzet Mikropumpen 2ML4 war eine ventrale subkutane Implantation nicht möglich. Die Pumpen wurden dorsal in eine subkutane Tasche paravertebral implantiert. Der 2 cm lange Schnitt zum Einbringen der Pum-

pen lag rechtwinklig zur Wirbelsäule 1 cm cranial der Schwanzwurzel. Der an der Pumpe befestigte Schlauch wurde subcutan nach ventral geführt und dort, wie in 3.5.4., in die gebildete Tasche der Mm. obliquii eingenäht.

3.5.5.2. Implantationstechnik: Alzet Mikropumpen 2ML4 - mit Gelastypt -

Die Implantation der Pumpen erfolgte wie in 3.5.5.1. beschrieben. Der einzige Unterschied bestand darin, daß die Schlauchspitze zwischen den Mm. obliquii in einem zusätzlich eingebrachten Gelastypt-Gelatineschwämmchen mündete.

3.6. Explantationstechnik

Die Tiere wurden per Genickschlag getötet, das Fell der Bauchregion großzügig aufgeschnitten und die Stelle der Implantation aufgesucht. Das Explantat wurde mit dem Skalpell so umschnitten, daß es von den Muskelschichten der Mm. obliquii umschlossen blieb.

Befand sich ein Schlauch in dem zu explantierenden Gewebe (3.5.4./3.5.5.), wurde dieser vor dem Herauspräparieren der Muskeltasche vorsichtig gezogen.

Bis zur weiteren Verwendung wurde das Explantat in isotoner Kochsalzlösung (für 3.7.) oder 60 %igem Ethanol (für 3.8.) aufbewahrt.

3.7. Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase (Orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1.)

Zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten der AP wurde die Messung immer sofort nach der Explantation (3.6.) durchgeführt.

3.7.1. Aufarbeitung der Explantate zur Messung der alkalischen Phosphatase

Um die AP-Aktivität in den Explantaten bestimmen zu können, wurden diese mit 10 ml isotoner Kochsalzlösung und 1 Tropfen Triton-X-100 mit dem Messerhomogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde in der Christ-Zentrifuge 10 Min. mit 4000 Upm $\triangleq$ 2200 xg (r=av) zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

3.7.2. Meßprinzip der alkalischen Phosphatase

Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatmonoestern. Zur Messung wurde p-Nitrophenylphosphat verwendet:

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} + H_2O \xrightarrow{AP} \text{p-Nitrophenol} + p_i$$

Die Extinktionsdifferenz/Zeit bei 405 nm ist ein Maß für die AP-Aktivität.

3.7.3. Messung der AP-Aktivität

Es wurde der "Alkalische Phosphatase-Test" von Merck verwendet. In eine Küvette wurde pipettiert: 2 ml Diäthanolamin-Puffer (pH = 9,8), 13 mMolar an p-Nitrophenylphos-

phat. Mit der Zugabe von 100 µl des Überstandes aus 3.7.1. wurde der Test gestartet. Die Extinktionsänderung wurde mit einem Zeiss-Photometer gemessen und von einem Potentiometerschreiber aufgezeichnet. Aus diesen Diagrammen wurde jeweils die Steigung (= $\triangle$ E/Min.) ermittelt und in 3.7.4. eingesetzt.

3.7.4. Berechnung der AP-Aktivität

Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich durch Umformung und Differenzierung nach der Zeit die Enzymaktivität:

$$\frac{\triangle c}{\triangle t} = \frac{\triangle E}{\triangle t} \times \frac{1}{\varepsilon \cdot d}$$

unter Berücksichtigung der Verdünnung in der Küvette:

$$\frac{\triangle c}{\triangle t} = \frac{\triangle E}{\triangle t} \times \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \times \frac{V}{v} \quad (U/ml)$$

Als Extinktionskoeffizient für p-Nitrophenol wurde $\varepsilon = 18{,}5\ cm^2/\mu mol$ verwendet.

Dabei ist:
- E = Extinktion
- ε = Extinktionskoeffizient
- c = Konzentration in µMol/ml
- d = Schichtdicke in der Küvette
- V = Küvettenvolumen
- v = Probenvolumen

Die so berechneten Einheiten wurden in diesem Fall mit 10 multipliziert, da das Explantat in 10 ml Kochsalzlösung gepottert wurde (s. 3.7.1.). Zum Vergleich der Aktivitäten der verschiedenen Implantate wurde dieses Ergebnis durch das in Gramm ausgedrückte Gewicht der implantierten

osteoinduktiven Substanz dividiert. Damit erhielt man die Enzymaktivität in Units pro Gramm Implantat.

3.8. Histologie

Die nach 3.6. gewonnenen Explantate wurden in 60 %igem Ethanol aufbewahrt, bis die jeweilige Versuchsreihe abgeschlossen war. Anschließend wurden die Explantate "en bloc" zum Anfertigen der Schnitte gegeben.

Die 6 µm dicken Paraffinschnitte wurden aus drei Ebenen der Explantate angefertigt. Gefärbt wurden die Schnitte nach Kossa und Masson-Goldner.

3.9. Anfertigung der Mikrofotografien

Die wichtigsten histologischen Präparate wurden mit dem Zeiss-Fotomikroskop fotografiert. Die Belichtung erfolgte auf einem Kodak Ektachrome Professional Film, 50 ASA, Kunstlicht.

4. ERGEBNISSE

4.1. Marbagelan

Von den nach 3.4.1. aufgearbeiteten Marbagelanimplantaten wurden 6 Stück nach 3.5.2. in 3 Tiere implantiert. Ein Tier verstarb innerhalb von 24 Stunden nach der Implantation. Die beiden anderen Tiere wurden nach 12 Tagen getötet und in den Explantaten (s. 3.6.) die alkalische Phosphatase gemessen (s. 3.7.):

		△E/Min. (Mittel aus 2 Best.)	U/ml	U/g
1. Tier	Expl. 1	0,015	0,017	1,7
	Expl. 2	0,355	0,403	40,3
2. Tier	Expl. 1	0,25	0,281	28,0
	Expl. 2	0,175	0,199	19,9

Mit Ausnahme des ersten Explantates, in dem die AP-Aktivität den "Rauschpegel" nicht überschreitet, war in den drei anderen Explantaten eine deutliche AP-Aktivitätserhöhung zu messen. Ob diese Aktivitätserhöhung als Zeichen einer gesteigerten Osteoblastenaktivität anzusehen ist, kann so nicht entschieden werden.

4.2. Sephadex G 25

Von den sechs vorbereiteten Sephadex-Gelatinekapsel-Implantaten (s. 3.4.3.) konnten nur zwei vor Auflösung der

Kapseln implantiert werden. Die anderen Gelatinekapseln hatten sich bereits vor der Darstellung der Muskeltasche zwischen den Rattenbauchmuskeln aufgelöst, so daß die quantitative Implantation des beladenen Sephadex unmöglich war.

Die beiden implantierten Kapseln wurden 12 Tage in dem Tier belassen. In den Explantaten wurde die alkalische Phosphatase bestimmt (s. 3.7.):

	△E/Min (Mittel aus 2 Best.)	U/ml	U/g
Expl. 1	0,065	0,074	7,4
Expl. 2	0,016	0,018	1,8

Da es sich hier um keine bzw. unwesentliche Erhöhung der AP-Aktivität handelt, wurde Sephadex G 25 zu weiteren Versuchen als Träger der osteoinduktiven Substanz nicht weiter verwendet.

4.3.1. Kollagen, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung (3.1.1.)

Die vier nach 3.4.6.1. aufgearbeiteten Implantate wurden zwei Ratten je beidseits implantiert. Auf Grund des geringen Verlustes bei der Aufarbeitung lag die implantierte Menge an aktiver Substanz zwischen 45 und 50 mg.

Ein Tier wurde nach 10, das andere nach 17 Tagen getötet. Die exakte Explantation nach 3.6. wurde dadurch erschwert, daß nach 10 Tagen die Implantationsstelle nur schwach, nach 17 Tagen fast gar nicht mehr makroskopisch erkennbar

war. Ein Tumor, sei es neoplastischer oder entzündlicher Genese, konnte an allen vier Explantationsstellen nicht eruiert werden.

Von allen vier Explantaten wurden histologische Schnitte in drei Ebenen angefertigt und nach Kossa und Masson-Goldner gefärbt. In den nach Masson-Goldner gefärbten Schnitten fand sich eine bindegewebige Struktur, die von den Mm. obliquii abd. umgeben war; in den nach 10 Tagen entnommenen Explantaten deutlich mehr als in den nach 17 Tagen entnommenen. Es konnte keine knochenähnliche oder an Knochen erinnernde Struktur ausgemacht werden.

In den nach Kossa gefärbten Schnitten war weder nach 10 noch nach 17 Tagen eine Ossifizierung bzw. Verkalkung erkennbar.

4.3.2. Kollagen, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung

Die sechs Implantate, nach 3.4.6.2. vorbereitet, wurden drei Tieren je beidseits implantiert. Dabei enthielt jedes Implantat 50 mg der aktiven Substanz.

Das erste Tier wurde nach 12 Tagen getötet. An beiden Implantationsstellen fanden sich kirschgroße Tumoren, aus denen sich nach dem Aufschneiden eine serös-eitrige Flüssigkeit entleerte. Auf Grund dieser Entzündung wurde auf eine Histologie verzichtet. Das zweite Tier, nach 16 Tagen getötet, wies auf einer Seite eine entzündliche Implantationsstelle auf. Beim dritten Tier, nach 20 Tagen getötet, waren die Implantationsstellen entzündungsfrei.

Die drei nicht entzündeten Explantate wurden histologisch

in drei Schnittebenen untersucht. In der Masson-Goldner Färbung fand sich auch hier eine bindegewebige Struktur, die von Muskeln umgeben war; in den Explantaten des nach 16 Tagen getöteten Tieres unwesentlich mehr als in den beiden anderen, 20 Tage im Tier belassenen Implantaten. In den nach Kossa gefärbten Präparaten konnte keinerlei Verkalkung festgestellt werden.

4.3.3. Kollagen - Leerwerte

Das nach 3.4.6.4. umgearbeitete Kollagen wurde in vier Portionen, je 57 mg, in zwei Ratten als Leerwerte für 4.3.1. und 4.3.2. implantiert. Die Tiere wurden nach 10 und 17 Tagen getötet. Das Auffinden der Implantatiosstellen war vor allem beim zweiten Tier erschwert, da das Kollagen schon zum größten Teil abgebaut und resorbiert worden war. Die vier entzündungsfreien Explantate wurden in drei Ebenen geschnitten und gefärbt.

In den nach Masson-Goldner gefärbten Schnitten war im Zentrum Bindegewebe (Kollagen) erkennbar, in den 10-Tage-Explantaten noch deutlich mehr als in den 17-Tage-Explantaten. Dieses Bindegewebe war umgeben von den unveränderten Muskelschichten der Mm. obliquii abd. In den nach Kossa gefärbten Schnitten war keinerlei Ossifizierung oder Verkalkung erkennbar.

4.3.4. Kollagen, beladen mit Lyophilisat der Essigsäure-Entkalkung

Die sechs Implantate nach 3.4.6.3. wurden drei Tieren implantiert und 15 Tage zwischen den Rattenmuskeln belassen. Bei der Explantation zeigte eines der Implantate

Entzündungszeichen, es wurde verworfen. An den anderen Explantaten war keine Knochenbildung oder Kalzifizierung makroskopisch erkennbar. In diesen Explantaten wurde die alkalische Phosphatase bestimmt (3.7.):

		Δ E/Min. (Mittel aus 2 Best.)	U/ml	U/g
1. Tier	Expl. 1	0,042	0,048	2,38
	Expl. 2	0,041	0,047	2,3
2. Tier	Expl. 1	0,050	0,057	2,84
	Expl. 2	0,051	0,058	2,89
3. Tier	Expl. 1	0,033	0,037	1,87

Die in der rechten Spalte angegebenen U/g Implantat sind berechnet auf eine Implantation von 100 mg aktiver Substanz. Da sich aus dem Aufarbeitungsmodus (s. 3.1.2.) die tatsächlich implantierte Menge an aktiver Substanz nicht berechnen läßt, ist man hier auf Schätzungen angewiesen: Es sind mit Sicherheit weniger als 100 mg aktiver Substanz implantiert worden, denn Kollagen und Salze sind aus dem Gemisch nicht entfernt worden - es war ja auch eine Bindung der aktiven Substanz an Kollagen angestrebt. Also müßten dementsprechend mehr Units pro Gramm Implantat vorhanden sein (s. 3.7.4.). Andererseits ist die tatsächlich vorhandene AP-Aktivität (in U/ml) so gering, daß von einer tatsächlichen AP-Aktivitätsverstärkung nicht gesprochen werden kann.

4.3.5. Beurteilung von Kollagen als Trägersubstanz

Im Vergleich der in 4.3.3. gewonnenen histologischen Ergebnisse mit der Histologie der beladenen Kollagenexplantate aus 4.3.1. und 4.3.2. können demnach keine wesentlichen Differenzen herausgestellt werden:

- die nach Masson-Goldner gefärbten Präparate unterscheiden sich bestenfalls in dem Umfang des zentral vorhandenen Bindegewebes, welches ja in Form von Kollagen in die Muskeltasche eingebracht wurde. Es zeigte sich also eher die hohe Abbaurate des Kollagens im Rattenmuskel, als eine Ossifizierung irgendwelcher Genese.
- Auch die nach Kossa gefärbten Schnitte zeigten keinerlei Unterschiede zwischen beladenen und unbeladenen Kollagenexplantaten. In keinem der Präparate war eine Schwarzfärbung, kennzeichnend für eine Verkalkung, erkennbar.

Das Fehlen der Differenzen zwischen beladenem Kollagen und Kollagen-Leerwerten läßt erkennen, daß die auf diese Weise isolierten Substanzen (3.1.1. und 3.2.2.), an Kollagen gebunden, keinen osteoinduktiven Effekt im Rattenmuskel auslösen können. Da nicht feststellbar war, in welcher Form, oder ob überhaupt, die aktiven Substanzen an das Kollagen adsorbiert waren, kann hier nicht entschieden werden:

- ob die Substanzen nach Implantation sofort in Lösung gingen und auf dem Blutweg fortgespült wurden;
- ob sie enzymatisch abgebaut wurden, bevor sie wie gewünscht wirken konnten (z.B durch induzierte Proteinasenwirkung durch das iatrogen in den Muskel eingebrachte Fremdprotein);
- ob sie durch die Aufarbeitung inaktiviert wurden;
- oder ob sie überhaupt wirksam waren.

Auch die nach 4.3.4. gewonnenen Ergebnisse, also keine

Verstärkung bzw. Induzierung der AP-Aktivität durch die Implantate, lassen Kollagen als Trägersubstanz ausscheiden.

4.4.1. Fibrinkleber, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung

Die fünf nach 3.4.4.1. hergestellten Koagel wurden drei Tieren (2 mal doppelseitig, 1 mal einseitig) nach 3.5.2. implantiert. Wieviel von der aktiven Substanz aus 3.1.1. in jedem einzelnen der Koagel eingeschlossen oder gebunden wurde, kann hier auf Grund des Aufarbeitungsmodus nicht angegeben werden. Die beidseits operierten Tiere wurden nach 10 und 14 Tagen, das einseitig operierte Tier nach 18 Tagen getötet. Beim Entnehmen der Explantate fanden sich keinerlei Entzündungszeichen oder andere Besonderheiten.

Von den fünf Explantaten wurden histologische Schnitte in jeweils drei Ebenen angefertigt und nach Kossa und Masson-Goldner gefärbt.

In allen nach Masson-Goldner gefärbten Schnitten ließen sich im Zentrum noch die Reste des Fibrinimplantates erkennen. In dem nach 18 Tagen entnommenen Explantat war deutlich mehr Fibrinkleber metabolisiert worden, als in dem nach 10 Tagen entnommenen. An Knochen erinnernde Strukturen, wie Knochenbälkchen, Knorpel oder vermehrt bindegewebige Strukturen, konnten in keinem der Präparate ausgemacht werden.

Auch in den nach Kossa gefärbten Präparaten ließen sich keinerlei knochenähnliche Strukturen oder Verkalkungen irgendwelcher Art erkennen.

4.4.2. Fibrinkleber, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung

Die sechs Koagel nach 3.4.4.2. wurden drei Ratten je beidseits in die gebildeten Muskeltaschen implantiert. Jedes dieser Koagel enthielt etwa 50 mg des Lyophilisates der säulenchromatographischen Auftrennung (s. 3.2.2.). Ganz exakt konnte die Beladung dieser Fibrinkoagel mit der aktiven Substanz jedoch nicht erfolgen: Einerseits konnte die benutzte Duplojekt-Kanüle auf Grund der hohen Viskosität des Fibrinklebers nicht millimetergenau entleert werden, und andererseits konnte die Bindung, bzw. Einlagerung der aktiven Substanz an/in die Fibrinkoagel nicht überprüft werden.

Die drei Tiere wurden nach 12, 16 und 20 Tagen getötet und die eingebrachten Fibrinkoagel nach 3.6. explantiert. Die Explantate wurden in drei Ebenen geschnitten und gefärbt.

In den nach Masson-Goldner gefärbten Schnitten war eine deutliche, mit der Dauer der Implantation korrelierende Abnahme des im Zentrum vorhandenen Fibrinkoagels zu erkennen; in den 20-Tage-Explantaten war der Rest dieses Fibrins nur noch mikroskopisch aufzufinden. Irgendwelche Ossifizierungszeichen, die ja logischerweise am Rand der Implantate hätten entstehen können, waren in keinem der Präparate zu finden.

Auch die nach Kossa gefärbten Schnitte wiesen keinerlei Verkalkung auf, die für eine beginnende Ossifizierung sprechen könnte.

4.4.3. Fibrinkleber - Leerwerte

Die nach 3.4.4.3. aufgearbeiteten Kresol wurden drei Ratten je beidseits als Leerwerte implantiert. Die Tiere wurden nach 10, 14 und 18 Tagen getötet. Die Explantate, alle frei von Entzündungszeichen, wurden in drei Ebenen geschnitten und nach Kossa und Masson-Goldner gefärbt.

In den nach Masson-Goldner gefärbten Präparaten war eine deutliche Abnahme des von Muskelschichten umgebenen Fibrinzentrums, korrelierend mit der Zeit, festzustellen.

Auch in den nach Kossa gefärbten Schnitten waren keine anderen Strukturen oder irgendwelche Verkalkungen erkennbar.

4.4.4. Beurteilung von Fibrinkleber als Trägersubstanz

Vergleicht man die Versuche mit beladenem Fibrinkleber (4.4.1. und 4.4.2.) mit den Fibrinkleber-Leerwerten (4.4.3.), ergibt sich folgendes:

- In den nach Masson-Goldner gefärbten Präparaten unterscheiden sich die histologischen Strukturen in den Explantaten der beiden beladenen Fibrinkleber nicht von den Strukturen der Fibrinkleber Leerwert Explantate.

- Bei allen Explantaten war ersichtlich, daß das humane Fibrin (für die Ratten also Fremdprotein) sehr gut vertragen wurde. In keinem Fall kam es zu Entzündungen oder irgendwelchen Reaktionen (z.B. Abstoßung), die zum Tod eines der Tiere geführt hätten.

- An allen Fibrinkleber-Explantaten konnte gezeigt werden, daß das Fibrin durch die ratteneigenen Enzymsysteme kontinuierlich abgebaut wurde, unabhängig davon, ob es sich um beladenes oder unbeladenes Fibrin handelte.

- bei den Versuchen 4.4.1. und 4.4.2. muß auch die vorhandene aktive Substanz enzymatisch abgebaut und/ oder mit dem Blut fortgeschwemmt worden sein, bevor sie wirken konnte.

- In den nach Kossa gefärbten Präparaten konnten die beladenen und unbeladenen Fibrinkleber-Implantate nicht unterschieden werden. In keinem der Präparate konnte eine Ossifizierung oder Verkalkung festgestellt werden.

Auf Grund der hier erörterten Ergebnisse wurde Fibrinkleber als Träger für osteoinduktive Substanz nicht weiter verwendet.

4.5.1. Ethibloc Okklusionsgel, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung

Entsprechend der Beschreibung in 3.4.5.1. wurden vier Ethibloc-Implantate hergestellt: 2 mit 1/2 ml und 2 mit 1,0 ml Ethibloc. Sofern durch das Ausfällen des Ethiblocs mit Wasser kein Lyophilisat der Salzsäureentkalkung (s. 3.1.1.) im Wasser in Lösung ging, enthielt jedes Implantat 50 mg der aktiven Substanz.

Zur Implantation der relativ großen 1 ml-Ethiblocklumpen mußte der Muskelschnitt im M. obliquus abd. sup. verlängert und die Muskeltasche maximal vergrößert werden, was eine Erhöhung des Operationstraumas und erhöhtes Infektionsrisiko bedeutete.

Die beiden 1/2 ml Ethibloc-Implantate wurden 11 Tage in dem einen Tier belassen, die beiden 1 ml-Implantate 18 Tage in dem zweiten Tier. Eines der 1 ml-Implantate war allerdings in der Muskeltasche vereitert, so daß es verworfen wurde. Die drei erhaltenen Explantate machten bei

der Explantation einen völlig inerten Eindruck. Soweit erkennbar, waren sie in keiner Weise abgebaut worden, die Form der Ethiblocklumpen bei der Explantation war die gleiche wie bei der Implantation. Von den drei Explantaten wurden histologische Schnitte angefertigt und nach Kossa und Masson-Goldner gefärbt.

In den nach Masson-Goldner gefärbten Präparaten war in allen drei Ebenen und allen drei Explantaten das unveränderte Ethibloc im Zentrum zu erkennen, umgeben von einem unspezifischen Granulationsgewebe. In den Randbezirken des Explantates fand sich keinerlei Hinweis auf eine Ossifizierung oder knochenähnliche Struktur.

Auch die nach Kossa gefärbten Schnitte konnten keine Verkalkung oder Ossifizierung zeigen.

4.5.2. Ethibloc Okklusionsgel, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung

Die nach 3.4.5.2. aufgearbeiteten Minikoagel wurden drei Ratten je doppelseitig implantiert. Diese Implantation der Minikoagel erwies sich als einfacher und weniger traumatisch als die Implantation eines einzigen großen Ethiblocklumpens (s. 4.5.1.).

Die Implantate wurden 12, 16 und 20 Tage in den Tieren belassen. Die nach 12 Tagen entnommenen Explantate waren beide infiziert, so daß eine Weiterverarbeitung nicht möglich war. In den Tieren, die nach 16 und 20 Tagen getötet wurden, waren die Explantate entzündungsfrei, so daß sie histologisch untersucht werden konnten.

Die nach Masson-Goldner gefärbten Schnitte ergaben, daß

sich die implantierten Minikoagel so gut wie unverändert in der Muskeltasche befanden. Sie waren von Granulationsgewebe und Bindegewebe umgeben, welches auch teilweise in die von den Koageln gebildeten Spalten eingewachsen war. In den nach 20 Tagen entnommenen Explantaten war lediglich etwas mehr Bindegewebe als in den 16-Tage-Explantaten vorhanden. In keinem dieser Präparate waren knochenähnliche Strukturen zu erkennen.

In den nach Kossa gefärbten Schnitten konnte in keinem Fall eine Ossifizierung festgestellt werden.

4.5.3. Ethibloc Okklusiosgel - Leerwerte

Als Vergleich zu den beladenen Ethiblocträgern wurden vier Ethiblockoagel nach 3.4.5.3. hergestellt. Diese Koagel wurden zwei Ratten je beidseits implantiert und 11 und 18 Tage in den Tieren belassen.

In den nach Kossa und Masson-Goldner angefärbten Präparaten zeigte sich keinerlei Auflösung der Ethiblockoagel, weder nach 11 noch nach 18 Tagen. Die 18-Tage-Explantate waren etwas stärker als die 11-Tage-Explantate von Bindegewebe umwachsen. Eine Verkalkung konnte in keinem der nach Kossa gefärbten Schnitte nachgewiesen werden.

4.5.4. Beurteilung von Ethibloc Okklusionsgel als Trägersubstanz

Im Vergleich der beiden beladenen mit dem unbeladenen Ethiblocträger wurde folgendes festgestellt:

- In keinem Fall kam es zu dem gewünschten Abbau des Trägers. Die das Explantat umgebenden Granulozyten und das gebildete Bindegewebe machten deutlich, daß

das Ethibloc als Fremdkörper im Rattenmuskel abgekapselt wurde.

- In den nach Masson-Goldner gefärbten Schnitten konnten keine strukturellen Unterschiede zwischen beladenem und unbeladenem Ethibloc erkannt werden. Es kam zu keiner Ossifizierung.

- Die aktive Substanz, mit denen die Implantate nach 3.4.5.1. und 3.4.5.2. beladen wurden, wurde im Rattenmuskel inaktiviert, vom Ethibloc-Implantat nicht freigegeben oder war von vornherein inaktiv.

- Auch in den nach Kossa gefärbten Präparaten konnte kein Unterschied zwischen beladenen und unbeladenen Explantaten beobachtet werden. In keinem der histologischen Schnitte war eine Verkalkung erkennbar.

Da das Ethibloc den geforderten Eigenschaften eines Trägers, wie gute Freigabe des adsorbierten Stoffes bei eigener Auflösung im Muskel bzw. minimaler Irritation des Muskelgewebes in keiner Weise nachkam, wurde es als ungeeignetster Träger dieser Versuche nicht weiter verwendet.

4.6.1. Gelastypt, beladen mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung

Nach 3.4.2.1. wurden vier Gelastypt-Implantate hergestellt und zwei Tieren je beidseits implantiert. Jedes Implantat erhielt 100 mg des Lyophilisates der Salzsäureentkalkung.

Nach 11 und 18 Tagen wurden die Tiere getötet und die Explantate entnommen. In den nach 18 Tagen, gegenüber den nach 11 Tagen entnommenen Explantaten, ließ sich bereits makroskopisch eine deutliche Volumenabnahme des implantierte Gelastypt erkennen. Die Explantate wurden geschnit-

ten und nach Masson-Goldner und Kossa gefärbt.

In den nach Masson-Goldner gefärbten Schnitten dominierte der verbliebene Rest des Gelastypt durch seine leuchtend rote Farbe. Hier war es noch deutlicher zu erkennen, daß bereits ein Großteil des Gelastypt metabolisiert bzw. umgebaut worden war. Die Implantate waren, z.T. infiltrierend, von Bindegewebe umwachsen. Die so entstandenen, hier grün gefärbten Strukturen (s. auch Abb. 2), erinnern teilweise an Knochenbälkchen.

In den nach Kossa gefärbten Präparaten konnte aber keine Verkalkung gefunden werden.

4.6.2. Gelastypt, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung

24 Gelastypt-Schwämmchen wurden nach 3.4.2.1. mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung (3.2.2.) beladen. Um eine bessere Verteilung der Substanz in den Schwämmchen zu erreichen, wurde die Konzentration hier so gewählt, daß 50 mg Lyophilisat in 1/2 ml Ampuwa auf ein Schwämmchen geträufelt wurden. Nach dem Trocknen wurde das so behandelte Gelastypt 12 Ratten je beidseits implantiert.

Zwei der Tiere starben innerhalb von 24 Stunden. Zur Erstellung einer Zeitabhängigkeit der Wirkung der Implantate wurde je ein Tier nach 6,8,9,10,11,12,13,14,16 und 19 Tagen getötet. In keinem der Explantate konnten makroskopisch Entzündungszeichen festgestellt werden. In den Explantaten nach 6 und 8 Tagen war durch die Muskelschichten das gelblich schimmernde Gelastypt noch deutlich zu erkennen; ebenso nach 9 und 10 Tagen, allerdings war auch

schon eine Größenabnahme der Implantate beobachtbar. Vom 11. bis zu 19. Explantationstag nahm die Größe der Explantate ständig weiter ab, so daß sie häufig nur noch erkannt werden konnten, wenn die herauspräparierten Muskelschichten gegen eine helle Lampe gehalten wurden. In keinem der Explantate konnten makroskopisch Ossifizierungszeichen, Verkalkungen oder ähnliches festgestellt werden.

Erst die nach Masson-Goldner gefärbten Schnitte der Explantate zeigten in den Strukturen eine gewisse Ähnlichkeit mit Präparaten der desmalen Knochenbildung (Abb. 2/ Abb. 3).

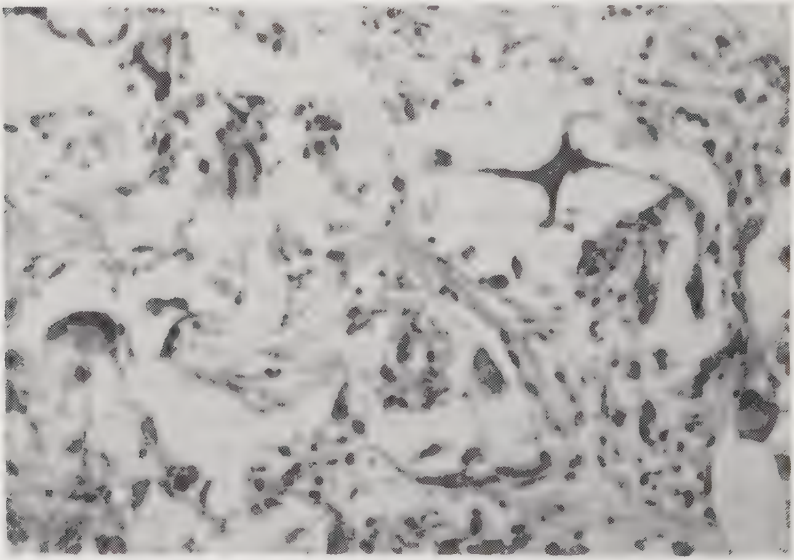

Abb. 2, Vergr. 150-fach

Abbildung 2 zeigt die knochenbälkchenähnlichen, hier grün gefärbten Strukturen, wie sie in einem 8 Tage im Tier verbliebenen Präparat beobachtet wurden. Das Rote markiert den Randbezirk des Gelastypt. Abbildung 3 zeigt im Ver-

gleich dazu die HE gefärbte desmale Deckknochenbildung eines menschlichen Feten.

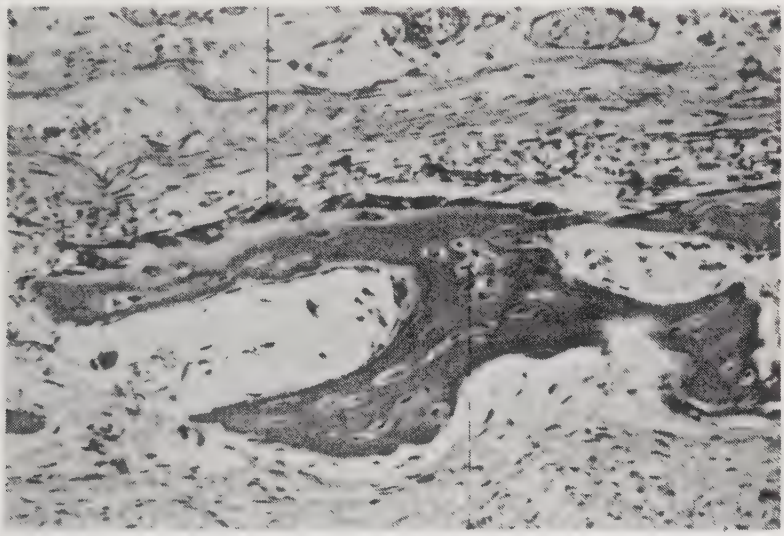

Abb. 3, Vergr. 150-fach

Die Histologie erklärt auch die zeitliche Größenabnahme der Explantate. Abbildung 4 zeigt einen der Schnitte, der aus einem der 19 Tage im Tier belassenen Implantate gefertigt wurde. Das Gelastypt ist bis auf einen minimalen Rest fast vollständig abgebaut worden, man erkennt es noch schwach rosa links unten im Bild. Die grün gefärbten, knochenbälkchenähnlichen Bindegewebssepten sind im Vergleich zu den 8-Tage-Präparaten deutlich verschmälert, werden also ebenfalls abgebaut.

In den nach Kossa gefärbten Schnitten sind deutlich einige Verkalkungen erkennbar (Abb. 5). Diese Verkalkungen finden sich am Rand der Explantate, dicht an der Muskel-

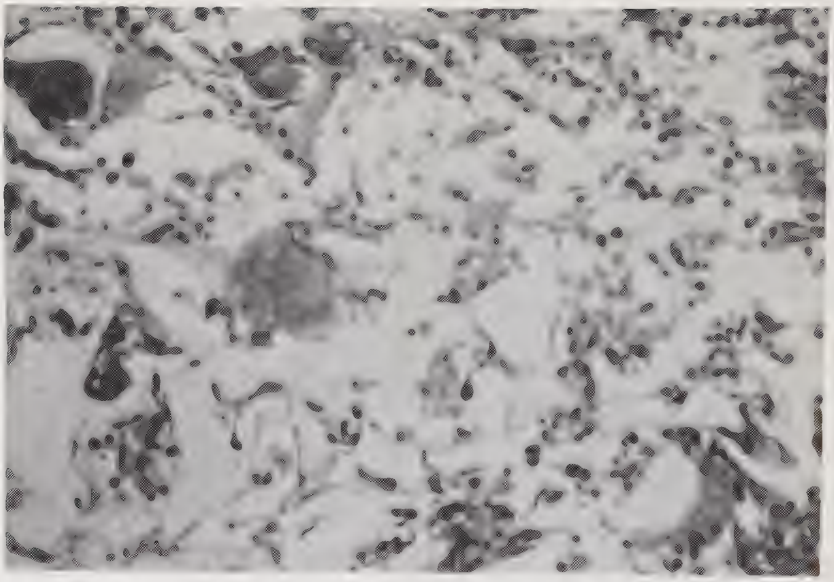

Abb. 4, Vergr. 150-fach

Abb. 5, Vergr. 60-fach

grenze. Sie sind nicht mit den in der Masson-Goldner-Färbung grüngefärbten bindegewebigen Septen gleichzusetzen, sondern liegen weiter außen, quasi in der von den Implantaten gebildeten Kapsel. Die hier gezeigte Verkalkung wurde in einem 9-Tage-Präparat fotografiert.

4.6.3. Gelastypt - Leerwerte

Als Vergleich zu den beladenen Gelastypt Gelatineschwämmchen wurden vier unbeladene nach 3.4.2.2. aufgearbeitet und nach 3.5.2. implantiert. Die Tiere wurden nach 11 und 18 Tagen getötet, die Explantate entnommen, geschnitten und nach Masson-Goldner und Kossa gefärbt.

Die nach Masson-Goldner gefärbten Schnitte zeigten einen deutlichen Abbau des Gelastypt; bei der Explantation nach 18 Tagen waren die Implantationsstellen zwischen den Muskeln kaum noch zu erkennen. Mikroskopisch waren noch die Reste des Gelastypt, nach 18 Tagen deutlich weniger als nach 11 Tagen, zu erkennen.

In den nach Kossa gefärbten Präparaten konnte in keinem der Schnitte eine Verkalkung entdeckt werden.

4.6.4. Beurteilung von Gelastypt als Trägersubstanz

Im Vergleich der beladenen Gelastypt-Schwämmchen mit den unbeladenen ergibt sich folgendes:

- Die nach Masson-Goldner gefärbten Präparate aus 4.6.2. zeigen etwas kräftigere und knochenbälkchenähnlichere Bindegewebsstrukturen als die Schnitte der unbeladenen Gelastypt-Präparate. Inwieweit es sich hier tatsächlich um entstehende Knochenbälkchen handelt, kann

nicht entschieden werden, da eine Verkalkung dieser Strukturen nicht gezeigt werden konnte. Auch neu entstehende Knochenbälkchen sind primär noch unverkalkt (s. Abb. 3).

- Der Verkalkung steht auch der schnelle Gelastyptabbau entgegen. In allen Präparaten konnte, quasi von Beginn an, dieser Abbau gezeigt werden. Da Knochen im Muskel ja auch ein Fremdgewebe ist, ist anzunehmen, daß dieser ebenso wie das Gelastypt einer Metabolisierung unterworfen ist. Es scheint also, daß der schnelle und gewünschte Trägerabbau mit dem gleichzeitigen Knochenaufbau hier zwei nicht vereinbare Gegensätze darstellt. Die Ossifizierung wird so lange fortschreiten, wie noch osteogene Substanz dem Träger entnommen werden kann. Dieser für die Darstellung der osteoinduktiven Eigenschaften einer Substanz optimale Zeitpunkt ist bei der Trägersubstanz Gelastypt nach ca. 8 Tagen erreicht (s. Abb. 2).

- Auch die beobachtete Verkalkung in den nach Kossa gefärbten Präparaten der säulenchromatographischen Auftrennung war nach 8-10 Tagen am besten zu beobachten (s. Abb. 5). Ob bei weiter bestehendem Ossifizierungsreiz auch eine Verkalkung der als knochenbälkchenähnlich bezeichneten Bindegewebssepten auftreten würde, konnte nicht entschieden werden. In den nach Kossa gefärbten Präparaten der Gelastypt-Leerwerte und den mit Lyophilisat der Salzsäureentkalkung beladenen Schwämmchen zeigte sich demgegenüber in keinem der Schnitte eine Verkalkung.

Gelastypt erwies sich somit als einer der geeignetsten Träger dieser Versuche. Im Tier kommt es innerhalb von 10-14 Tagen zu einer fast vollständigen Metabolisierung dieser Implantate, so daß die störenden Eigenschaften derselben auf die Ossifizierung als minimal angenommen werden können. Auf Grund der positiven Ergebnisse kann auch davon ausgegangen werden, daß die an Gelastypt adsorbierten Substanzen nicht innerhalb kürzester Zeit, also einigen Stunden, vom Blut abtransportiert werden, sondern erst im Laufe

von einigen Tagen, korrelierend mit der Metabolisierung des Gelastypt, freigegeben werden.

Auch sind diese kleinen Gelatinschwämmchen gut zu handhaben, und die Beladung mit aktiven Substanzen sowie die Implantationen sind gut reproduzierbar.

4.7.1. Alzet Mikropumpen 2002, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung

Die nach 3.4.7.1. mit dem Lyophilisat aus dem 72-Stunden-Kollagenaseabbau gefüllten Pumpen wurden 14 und 24 Tage in den Tieren belassen.

Eine der Pumpen, die steril filtrierte Lösung, und zwei, die nicht steril filtrierte Lösung enthielten, wurden den Tieren nach 14 Tagen entnommen. Bei den drei Tieren waren die subkutanen, die Pumpe enthaltenden Taschen entzündet, nicht aber die zwischen den Muskeln eingenähte Schlauchspitze. Dort fand sich jeweils ein 3-5 mm großer Tumor von derber Konsistenz. Histologisch konnte jedoch weder eine knochenähnliche Struktur noch eine Verkalkung festgestellt werden.

Die beiden subkutanen Taschen der nach 24 Tagen explantierten Pumpen waren nicht entzündet, jedoch beide Schlauchspitzen aus den Muskeln herausgerutscht, so daß keine Erkenntnisse gewonnen werden konnten.

4.7.2. Alzet Mikropumpen 2002, beladen mit Lyophilisat des verkürzten Kollagenase-Abbaus

Die Tiere, die nach 3.4.7.1., 2. Ansatz, Pumpen implantiert bekamen, wurden alle nach 10 Tagen getötet.

An den beiden Schlauchspitzen der Pumpen, die mit ß-Glycerophosphat beschickt worden waren, fanden sich in dem einen Fall kein, in dem anderen ein knapp 2 mm messender Tumor. Da dieser Tumor noch von dem eingebrachten Schlauch durchstoßen war, verblieb so wenig Tumormasse, daß er histologisch nicht untersucht werden konnte.

An den beiden anderen Pumpen, die nur mit der Substanz des verkürzten Kollagenase-Abbaus gefüllt waren, fand sich an der einen Schlauchspitze eine Entzündung, an der anderen ein 5 mm messender Tumor. Die histologische Untersuchung, mit Färbungen nach Masson-Goldner und Kossa, ergab keine knochenähnliche Struktur und keine Verkalkung.

4.7.3. Beurteilung der Alzet Mikropumpen 2002

Da in keinem der Explantate ein positives Ergebnis gefunden wurde, ist anzunehmen, daß die Pumpen dem Geforderten nicht gerecht wurden. Die histologischen Untersuchungen der Explantate zeigten, daß eine begonnene Gewebsneubildung noch nicht abgeschlossen war. Da die Pumpen aber nach 2 Wochen leergepumpt sind, ist es auch nicht sinnvoll, sie länger im Tier zu belassen.

Auch der hohe Preis und die kompliziertere Operation, korrelierend mit einer höheren Infektionsrate, sprechen gegen die Pumpen.

4.8.1. Alzet Mikropumpen 2ML4, beladen mit Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftrennung

Im ersten Ansatz wurden drei Pumpen, beladen mit jeweils 500 mg Lyophilisat der säulenchromatographischen Auftren-

nung, in drei Tiere implantiert. Ein Tier verstarb nach 4 Tagen, die beiden anderen wurden nach 4 Wochen getötet. In dem einen dieser Tiere war die Schlauchspitze zwischen den Muskeln entzündet, bei dem anderen die Pumpe und der subkutane Schlauch; ein erkennbarer Tumor hatte sich an der Schlauchspitze nicht gebildet.

Im zweiten Ansatz wurden sechs gleich vorbereitete Pumpen in sechs Tiere implantiert, davon drei mit und drei ohne Gelastypt (s. 3.5.5.1. und 3.5.5.2.). Bei diesen Operationen wurde verstärkt auf die Sterilität der implantierten Schläuche und Pumpen und auch des Rattenfells geachtet. Bei der Explantation nach genau vier Wochen fand sich daher auch nur eine infizierte Schlauchspitze. Allerdings waren fünf der sechs Schlauchspitzen aus der Tasche zwischen den Mm. obliquii abd. in das subcutane Fettgewebe abgerutscht.

Die eine zwischen den Muskelschichten verbliebene Schlauchspitze - ohne Gelastypt - war nicht entzündet und zeigte einen Tumor mit einem Durchmesser von 7-8 mm. Die nach Masson-Goldner gefärbten Schnitte dieses Explantates zeigten einen bindegewebigen Tumor mit vielen Gefäßen. Eine deutliche knochenähnliche Struktur konnte nicht erkannt werden.

Die nach Kossa gefärbten Präparate zeigten, kreisförmig um den zentralen Schlauch, eine deutliche Verkalkung an der Tumor-Muskel-Grenze (Abb. 6).

4.8.2. Beurteilung der Alzet Mikropumpen 2ML4

Die hier verwendeten größeren Mikropumpen sind durchaus in der Lage, gelöste osteoinduktive Substanzen in einen

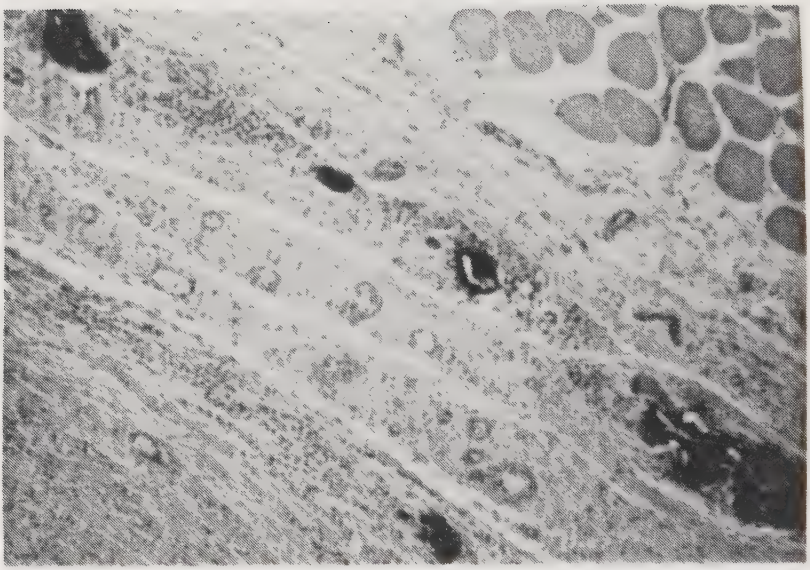

Abb. 6, Vergr. 60-fach

Muskel zu pumpen. Sieht man von den im ersten Ansatz implantierten Pumpen ab, spricht das Ergebnis allerdings - nur eine von sechs implantierten Pumpen brachte eine Erkenntnis - gegen die Pumpen. Offensichtlich sind diese Mikropumpen für die Ratten doch so groß, daß sich die Tiere durch ständige Bewegung des Fremdkörpers zu entledigen versuchen. Das führte dazu, daß die gut befestigten Schlauchspitzen aus den Muskeltaschen herausrutschten.

Auch die Verweildauer der Implantate von vier Wochen sowie die relativ lange dauernde Operation sprechen gegen die Pumpen als Screeningmethode zum Austesten löslicher osteoinduktiver Substanzen.

5. DISKUSSION

Knochen ist bisher durch nichts zu ersetzen. Bei einfachen Frakturen reicht im allgemeinen eine Schienung (Gipsverband) der Extremität oder eine Ruhigstellung des defekten Knochens, um eine natürliche Heilung zu erreichen. Bei komplizierten Brüchen, die ja durch die offene Wunde sowieso schon sepsisgefährdet sind, wird die Knochenheilung bzw. Funktionserhaltung durch Osteosynthesen (z.B. Platten, Fixateur externe) unterstützt. Durch den fehlenden Druck bei diesen Osteosynthesen der beiden Frakturenden gegeneinander kommt es häufig zu mangelhafter Kallusbildung, einem ursächlichen Grund für Pseudarthrosen. Auch bei Trümmerbrüchen ist häufig keine befriedigende Knochenheilung zu erzielen. Im Extremfall führt das zum Verlust der betroffenen Extremität. Es liegt also nahe, nach Möglichkeiten zu suchen, die die Knochenheilung beschleunigen, bzw. das Knochenwachstum induzieren.

Urist stellte 1967 die Hypothese eines "bone induction principle" (BIP) von Knochenmatrix-Implantaten im Muskel auf. Er beschrieb es als Produkt aus implantierter Matrix und eingewanderten Mesenchymzellen. BIP ist das Milieu zur Differenzierung neuer mesenchymaler Zellpopulationen in Knorpel, Knochen und Knochenmark. Morphologisch besteht es aus einem Netzwerk neuer Kollagenfibrillen, die von metachromatischer Grundsubstanz umgeben sind. Zur Induzierung eines Knochenwachstums implantierten Urist et al (1970a) mit 0,6 n Salzsäure dekalzifizierte Knochenmatrix in Kaninchenmuskel. Erste Knochenstrukturen erkannten sie nach zwei Wochen und konnten ein weiteres Wachstum über drei Wochen beobachten.

Diese knochenbildenden Vorgänge werden von einem "bone morphogenetic protein" (BMP) kotrolliert. BMP existiert

in der Knochenmatrix in enger Verbindung mit Kollagen und kann von diesem durch eine neutrale Proteinase abgespalten werden (Urist und Iwata, 1973b). Diese Kontrolle des BMP besteht in einer Modulation und Differenzierung von Mesenchymzellen des Muskels zu Knochen und Knochenmarkszellen (Urist und Strates, 1971; Price et al, 1976; Urist et al, 1983).

Ebenfalls mit Knochenmatrix experimentierten Reddi und Anderson 1976: Nach extraskelettaler Implantation beobachteten sie eine Knochenneubildung samt funktionellem Knochenmark. Die Chondroblasten und Osteoblasten entstanden dabei aus differenzierten Fibroblasten.

Die meisten Autoren arbeiteten und arbeiten, weil am erfolgversprechendsten, mit demineralisierter Knochenmatrix: Amler und Gold, 1980; Hanamura et al, 1980 a und b; Takagi, 1982; Tuli, 1978; Volpon, 1982.

Allerdings führten auch andere Isolierungen der osteogennen Substanz zum Erfolg. Yasui (1980) isolierte aus einer Kultur von Osteosarkomzellen eine Substanz, die er an Kollagen koppelte, gegen 0,02 m Na_2HPO_4-Lsg. dialysierte und in eine Muskeltasche bei Mäusen implantierte. 30 Tage später konnte er Knochenformationen in den Explantaten nachweisen.

In dieser Arbeit wurde eine ähnliche Isolierung durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden aber Rinderknochen und keine Osteosarkomzellen verwendet (3.1.2.). Im Gegensatz zu Yasuis Arbeit konnte hier während der Dialyse gegen Na_2HPO_4-Lsg. aber kein Präzipitat gewonnen werden. Ob in Rinderknochen ein essigsäurelöslicher osteogener Faktor, wie in Osteosarkomzellen, nicht vorhanden ist, oder hier ein Fehler in der Isolierung unterlaufen ist, kann an die-

ser Stelle nicht exakt beantwortet werden. Es ist aber anzunehmen, daß die Isolierung von osteoinduktiven Substanzen aus einer Osteosarkomzellkultur, die sich ja sowieso in der Proliferation befindet, deutlich einfacher ist. Der gesuchte osteogene Faktor müßte ja gerade hier vermehrt vorhanden sein. Auch daß der Faktor während der Osteogenese, quasi unmaskiert, durch die Essigsäure leichter extrahierbar ist, ist anzunehmen. Demgegenüber steht der nicht proliferative Rinderknochen, von dem nicht bekannt ist, ob er überhaupt die gleiche oder eine ähnliche osteogene Substanz enthält wie Osteosarkomzellen.

Es ist auch denkbar, daß ein in Rinderknochen vorhandener osteogener Faktor, im Gegensatz zum Faktor aus Osteosarkomzellen dialysierbar ist und in die Na_2HPO_4-Lösung diffundiert ist, die verworfen wurde. Falls der Faktor nicht dialysierbar ist, was eher anzunehmen ist, müßte er durch die angeschlossene Acetonfällung (3.1.2.) gefällt worden sein. Allerdings konnte die so gewonnene Substanz nach Implantation im Rattenmuskel keine nennenswerte Osteoinduktion auslösen, was durch die niedrigen AP-Aktivitäten (4.3.4.) gezeigt wurde. Es bleibt also die Annahme, daß der Faktor - sofern vorhanden - nicht durch 0,6 n Essigsäure aus Rinderknochen extrahierbar ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Salzsäureisolierung (3.1.1.) beruhte ebenfalls auf der Annahme, daß der oder zumindest ein osteogener Faktor in der Säure löslich ist. In der Literatur wurde außer der erwähnten Essigsäureisolierung von Yasui (1980) keine andere, mittels einer Säure durchgeführten Isolierung einer osteoinduktiven Substanz gefunden. Die hier erhaltene Substanz wurde auf Marbagelan als Träger implantiert. Die AP-Bestimmung in den nach 12 Tagen explantierten Geweben ergaben Aktivitäten bis zu 40 U pro Gramm Trockengewicht der Implantate. Diese

relativ hohen AP-Aktivitäten waren die Grundlage für die weiteren Experimente mit dieser Substanz auf den verschiedenen benutzten Trägern. In keinem der Versuche konnte aber mit dieser Substanz aus der Salzsäureisolierung ein morphologisches Korrelat für eine Knochenneubildung gefunden werden. Es ist daher die Frage, ob das Vorhandensein von höheren Aktivitäten der alkalischen Phosphatase tatsächlich einen sicheren Hinweis auf osteoblastäre Differenzierungsvorgänge gibt, wie Huggins und Urist (1970) und Urist (1970c) es beschrieben. Da diese Fragestellung nicht das Thema dieser Untersuchungen war, wurde im folgenden dieser Arbeit auf die Messung der AP verzichtet und die Beurteilung der Explantate nur noch histologisch durchgeführt.

Andere Autoren versuchten die Knochenneubildung mittels eines ersatzstarken Lagers zu erreichen. Mittelmeier und Katthage (1983) implantierten synthetischen Apatit mit gereinigtem xenogenen Tierkollagen. Als Vorteile beschrieben sie, daß es zu keinen Unverträglichkeitsreaktionen kam und das Implantat zu raschem Wiederaufbau natürlicher Knochenstrukturen führte. Es eignete sich besonders zum Füllen von Defekthöhlen in Knochen.

Auch Osborn et al (1978 und 1980) experimentierten mit Hydroxylapatit. Nach den Autoren ist es chemisch und kristallographisch mit dem natürlichen Knochenmaterial identisch. Sie erreichten eine Durchwachsung von synthetischem Material und Knochengewebe und charakterisierten so die Verbundosteogenese.

Diese Art der Induktion einer Osteogenese - mittels eines ersatzstarken Lagers - ist sicher eine elegante Art, die Knochenneubildung herbeizuführen. Mit der in dieser Arbeit aufgezeigten Osteogenese im ersatzschwachen Lager ist es

jedoch nicht zu vergleichen, denn hier soll eine Osteogenese induziert werden, ohne daß knochenähnliche Strukturen oder gar Knochen in der Nähe des Implantates vorhanden sind.

Das BMP, für sich allein oder in Verbindung mit Kollagen, wird in allen Veröffentlichungen als eine unlösliche Substanz beschrieben (Urist, 1970c; Urist und Iwata, 1973b). Bei der weiteren Auftrennung der Knochenmatrix isolierte Herr (Lit. Nr. 27) aber auch lösliche Faktoren, die das osteogen aktive Protein zu enthalten schienen. Wie bereits darauf hingewiesen, müßten diese löslichen Substanzen so zwischen die Bauchmuskeln der Ratte appliziert werden, daß sie ihre osteogene Funktion erfüllen können, bevor sie aufgelöst und auf dem Blutweg fortgespült werden. Eine Fixierung dieser Substanzen an einen implantierbaren Träger war das Ziel dieser Arbeit.

Zusammenfassend und wertend hier die mit den einzelnen Trägern gewonnenen Ergebnisse:

- Das Ethibloc Okklusionsgel (4.5.1.-4.5.4.), das bis zu 18 Tagen im Rattenmuskel belassen wurde, konnte in diesem Zeitraum in keiner Weise metabolisiert werden. Da auch in den Randbezirken des Ethibloc keinerlei Ossifizierung beobachtbar war, schied es als Träger aus.

- Die Fibrinkleber-Implantate (4.4.1.-4.4.4.) zeichneten sich durch eine gute Verträglichkeit und einen kontinuierlichen Abbau im Rattenmuskel aus. Die erwartete Ossifizierung trat nicht auf. Es war also entweder die applizierte osteogene Substanz nicht aktiv genug, oder sie konnte nicht so fest an das Fibrin-Implantat adsorbiert werden, daß sie nicht gleich wieder auf dem Blutweg fortgeschwemmt wurde. Die ungenaue Reproduzierbarkeit

der Beladung des Fibrinklebers mit osteogener Substanz, die negativen Ergebnisse und auch der hohe Preis führten zum Ausscheiden dieses Trägers aus der Versuchsreihe.

- Die Implantate mit Kollagen als Träger (4.3.1. -4.3.5.) konnten die gewünschten Forderungen ebenfalls nicht erfüllen. Zwar kam es in allen Fällen zu einer ausgezeichneten Metabolisierung des Kollagens, aber die Osteogenese blieb aus. Auch die Kopplung der Substanz aus der Essigsäureisolierung an Kollagen (3.1.2.), was oben schon ausführlich diskutiert wurde, führte zu keinem Erfolg.

- Die Alzet Mikropumpen 2002 (200 µl) konnten durch das 14-tägige Einpumpen der osteogenen Substanz keine deutliche Knochenbildung induzieren (4.7.1.). Auf Grund der histologischen Untersuchungen war anzunehmen, daß die Pumprate zu niedrig oder die Dauer des Pumpens zu kurz war.

- Bei den größeren Alzet Mikropumpen 2ML4 (2ml) war die Pumprate etwa 4 1/2 mal höher (2,2 µl/h statt 0,5 µl/h) und die Pumpdauer doppelt so lang (4 statt 2 Wochen) wie bei den kleineren Pumpen. In dem nach vier Wochen entstandenen Tumor an der Schlauchspitze der Pumpe konnte ein mit Gefäßen durchsetztes Gewebe beobachtet werden. Der Rand dieses Tumors, dicht an der Muskelgrenze, wies in der Kossa-Färbung eine deutliche Verkalkung auf (Abb. 6). Trotz dieser guten Ergebnisse konnten die Pumpen nicht weiter verwendet werden, da sie von den Tieren offensichtlich nicht toleriert wurden (s. auch 4.8.2.)

- Die Verwendung von Gelastypt-Gelatineschwämmchen zeigte bei diesen Versuchen die positivsten Ergebnisse. In den nach acht und neun Tagen entnommenen Explantaten waren deutlich knochenbälkchenähnliche Struk-

turen (Abb. 2) und Verkalkungen (Abb. 5) erkennbar (4.6.1. -4.6.4.). Gelastypt wurde im Tier gut, nach ca. 15 Tagen fast vollständig resorbiert. Es zeigte außerdem eine gute Handhabbarkeit und gute Reproduzierbarkeit in der Beladung mit der osteogenen Substanz.

Gelastypt-Gelatineschwämmchen werden schon seit langem in der Zahnheilkunde verwendet. Speziell beim Verschluß von Alveolen post extractionem wurde die gute Resorbierbarkeit beschrieben, auch bakteriostatische Wirkung durch Antibiotikazusatz und eine Förderung der Gerinnung mit Thrombinzusatz (Obermeier, 1955).

Zur Testung der Biokompatibilität implantierten Streckbein und Lorber (1978) Gelastypt in den Oberschenkel des Meerschweinchenhinterlaufs. Sie beobachteten eine Infiltration mit überwiegend neutrophilen Leukozyten mit einer anschließenden Organisation, Vaskularisation und Narbenbildung. Sie verglichen es mit den Vorgängen einer normalen Wundheilung. Allerdings beobachteten sie eine Resorptionszeit des Gelastypt von mehr als vier Wochen, was der von Schüle (1971) gefundenen Resorptionszeit von 14-21 Tagen widerspricht. Auch in der vorliegenden Arbeit war Gelastypt nach mehr als 14 Tagen kaum noch nachzuweisen.

Diese unterschiedlichen Angaben über die Dauer der Metabolisierung des Gelastypt oder auch eines anderen Trägers im Tiermuskel lassen generell die Frage nach der Implantationsdauer einer osteogen aktiven Substanz aufkommen:

- Unter der Voraussetzung, daß die AP einen eindeutigen Hinweis auf osteoblastäre Differenzierung gibt, scheint eine Implantationsdauer einer osteogenen Substanz von 10-20 Tagen auszureichen. Reddi und Huggins (1972) konnten ihr AP-Enzymmaximum am 10. Tag, Firschein und

Urist (1972) am 20. Tag messen. Als Mittelweg dazu wählte Fischer (1979) 17 Tage für die Implantationsdauer. In dieser Arbeit wurden deutlich erhöhte AP-Aktivitäten nach 12 Tagen gemessen (4.1.), allerdings mit einer Substanz, deren Osteogenität in späteren Versuchen histologisch nicht bewiesen werden konnte.

- Ein Anstieg des Kalziumgehaltes in den Explantaten kann nach 10 Tagen, mit einem Maximum nach 30 Tagen, gemessen werden (Firschein und Urist, 1972). Der Kalziumgehalt in den Explantaten ist ein wirksames Maß für die Osteogenität eines Implantates, da entmineralisierte Knochenmatrix nicht rekalzifiziert (Urist et al, 1967; Firschein und Urist, 1972). Die Messung erfolgte durch Veraschung bei 600 ^{o}C als quantitatives Maß der Knochenneubildung.

- Zur Erzielung von mikroskopisch erkennbaren Knochenstrukturen dürfte die mindeste Implantationsdauer bei etwa zwei Wochen liegen (Urist, 1970a). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit den Alzet Mikropumpen konnte allerdings nach zwei Wochen noch keine Ossifizierung beobachtet werden (4.7.), erst nach vier Wochen war in den Explantaten eine deutliche Kalzifizierung zu erkennen (4.8., Abb. 6).

Es ist denkbar, daß die unterschiedlichen Implantationsdauern zur Erzielung einer Osteogenese von der Reinheit der implantierten osteogenen Substanz abhängig sind. Bei der Implantation des relativ unspezifischen BMP, von dem wahrscheinlich nur ein Teil des Implantates tatsächlich osteogen wirkt, ist wohl mit einer länger dauernden und schwächeren Osteogenese zu rechnen, denn der aktive Faktor muß ja erst durch die übrige implantierte Substanz hindurchdiffundieren, um osteogen wirken zu können.

Bessere Osteoinduktionen wurden erzielt, wenn das im BMP enthaltene Kollagen durch Kollagenase abgetrennt wurde (Herr, Lit. Nr. 27). Diese osteoinduktive Wirkung konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (4.6.2. und 4.8.1.).

Andererseits ist auch noch nicht geklärt, ob die Osteogenese tatsächlich von einem einzigen Faktor induziert wird, oder ob eine multifaktorielle Induzierung notwendig ist.

Diese mono- oder multifaktorielle Induzierung ist aber von der unspezifischen Induzierung einer Osteogenese durch Kalziumchlorid, 40 %igen Alkohol (Heinen et al, 1949) oder auch elektrischen Strom (Reddi und Huggins, 1974) deutlich zu trennen. In dem hier behandelten Themenbereich geht es einzig darum, eine Substanz zu isolieren oder gar zu synthetisieren, die, in ein ersatzschwaches Lager implantiert, eine Osteogenese zu induzieren in der Lage ist.

Weitere Isolierungen werden zu klären haben, ob es den alleinigen osteoinduktiven Faktor gibt, oder mit welchen Substanzen dieser oder diese Faktoren gekoppelt werden müssen, um eine rasche und genügende Ossifizierung zu erreichen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Lösliche osteoinduktive Substanzen, aus Rinderknochen isoliert, wurden auf verschiedene Träger aufgebracht. Diese beladenen Träger wurden zwischen die musculi obliquii abdomini der Ratte implantiert. Eine dort einsetzende Knochenneubildung wurde durch Messung der alkalischen Phosphatase und durch histologische Schnitte, gefärbt nach Masson-Goldner und Kossa, verfolgt.

Es galt, einen Träger zu finden, der bei eigener Metabolisierung eine gute Freisetzung der aufgeladenen osteogenen Substanz im Rattenmuskel gewährleistet.

Folgende Träger wurden getestet:

- Ethibloc Okklusionsgel: Keine Metabolisierung im Tier und keine Ossifizierung beobachtbar.
- Fibrinkleber: Gute Verträglichkeit und gute Metabolisierung, aber keine Ossifizierungszeichen.
- Kollagen: Gute Metabolisierung, keine Osteogenese beobachtbar.
- Gelastypt-Gelatineschwämmchen: Gute Metabolisierung und deutliche Zeichen einer Osteogenese beobachtbar.
- Mikropumpen (Pumprate 0,5 µl/h für 2 Wochen und 2,2 µl/h für 4 Wochen): Mit den kleineren Pumpen keine, mit den größeren eine deutliche Ossifizierung erreichbar. Jedoch werden die größeren Pumpen von den Tieren schlecht toleriert.

Als bester Träger, auch in Bezug auf Handhabbarkeit und Reproduzierbarkeit bei der Beladung mit aktiver Substanz, erwies sich das Gelastypt-Gelatineschwämmchen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Amitani, K. und Y. Nakata: Sudies on a factor responsible for new bone formation from osteosarcoma in mice
   Calc. Tiss. Res. 17, 139-150 (1975)
2. Amitani, K., Y. Nakata und J. Stevens: Bone induction by lyophilized osteosarcoma in mice
   Calc. Tiss. Res. 16, 305-313 (1974)
3. Amler, M.H. und W. Gold: Osteopoietin - humoral induction factor in osteogenesis
   J. Periodontol. 51,4, 185-189 (1980)
4. Annersten, S.: Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und die Biochemie des Frakturkallus
   Acta Chir. Scand. 84, Suppl. 60, 1-181 (1940)
5. Axhausen, G.: Über den Vorgang partieller Sequestrierung transplantierten Knochengewebes nebst neuen histologischen Untersuchungen über Knochentransplantationen am Menschen
   Arch. klin. Chir. 89, 2281 (1909)
6. Barth, A.: Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen
   Arch. klin. Chir. 46, 409-417 (1893)
7. Baschkirzew, N.J. und N.N. Petrow: Beiträge zur freien Knochenüberpflanzung
   Dt. Zeitschr. f. Chir. 113, 490-531 (1912)
8. Becker, R.O.: Electrical osteogenesis - pro and con.
   Calcif. Tiss. Res. 26, 93-97 (1978)
9. Bertelsen, A.: Experimental investigations into postfoetal osteogenesis
   Acta Orthop. Scand. 15, 139-181 (1944)
10. Bessey, O.A., O.H. Lowry und M.J. Brock: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum
    J. Biol. Chem. 164, 321-329 (1946)

11. Bills, C.E., H. Eisenberg und S.L. Pallante: Complexes of organic acids with calcium phosphate: The von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral
Hopkins Med. J. 128, 194-207 (1971)

12. Brölz, B.: Einfluß verschiedener Vorbehandlungen auf die osteoinduktive Wirkung von Knochenmatrix und Knochengelatine
Med. Dissertation Tübingen (1982)

13. Buring, K. und M.R. Urist: Transfilter bone induction
Clin. Orthop. 54, 235-242 (1967)

14. Buring,K. und M.R. Urist: Effects of ionizing radiation of the bone induction principle in matrix of bone implants
Clin. Orthop. 55, 225-234 (1967)

15. Butler, W.T., A. Mikulski und M.R. Urist: Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity
J. dent. Res. 56, 228-232 (1977)

16. Chalmers, J.: Transplantation immunity in bone homografting
J. Bone Jt. Surg. 41-B, 160-179 (1959)

17. Chalmers, J., D.H. Gray und J. Rush: Observations on the induction of bone in soft tissues
J. Bone Jt. Surg. 57-B, 36-45 (1975)

18. Firschein, H.E. und M.R. Urist: The induction of alkaline phosphatase by extraskeletal implants of bone matrix
Calc. Tiss. Res. 7, 108-113 (1971)

19. Firschein, H.E. und M.R. Urist: Enzyme induction, accumulation of collagen, and calcification in implants of bone matrix
Clin. Orthop. 84, 263-274 (1972)

20. Fischer, H.P.: Untersuchungen zur osteoinduktiven Wirkung von Knochengelatine
Med. Dissertation Tübingen (1982)

21. Gallie, W.E. und D.E. Robertson: The repair of bone
Brit. J. Surg. 7, 211 (1920)

22. Hanamura, H.,Y. Higuchi, M. Nakagawa, H. Iwata, H. Nogami, M.R. Urist: Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix
Clin. Orthop. and Rel. Res. 148, 281-290 (1980a)

23. Hanamura, H., Y. Higuchi, M. Nakagawa, H. Iwata, M.R. Urist: Solubilization and purification of bone morphogenetic protein (BMP) from Dunn osteosarcoma
Clin. Orthop. and Rel. Res. 153, 232-240 (1980b)

24. Hartley, J. und S.S. Tanz: Experimental osteogenesis in rabbit muscle
Arch. Surg. 63, 845-851 (1951)

25. Heinen, J.H., G.H. Dabbs und H.A. Mason: The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscle of rabbits
J. Bone Jt. Surg. 31-A, 765-775 (1949)

26. Heiple, K.G., C.H. Herndon, S.W. Chase und A. Wattleworth: Osteogenic induction by osteosarcoma and normal bone in mice
J. Bone Jt. Surg. 50-A, 311-325 (1968)

27. Herr, G.: Biochemische Dissertation Tübingen
In Arbeit

28. Huggins, C.B., H.R. McCaroll und B.H. Blocksom: Experiments on the theory of osteogenesis
Arch. Surg. 32, 915-931 (1936)

29. Huggins, C.B. und M.R. Urist: Dentin matrix transformation of alkaline phosphatase and cartilage
Science 167, 896-898 (1970a)

30. Huggins, C.B., S. Wiseman und A.H. Reddi: Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone
J. Exp. Med. 132, 1250-1258 (1970b)
31. Iwata, H. und M.R. Urist: Protein polysaccharide of bone morphogenetic matrix
Clin. Orthop. 87, 257-274 (1972)
32. Kember, N.F.: Cell division in enchondral ossification
J. Bone Jt. Surg. 43-B, 824 (1960)
33. Levander, G.: A study of bone regeneration
Surg. Gynecol. Obstet. 67, 705-714 (1938)
34. Lexer, E.: Freie Transplantationen
Neue Deut. Chir. 246, 12 (1924)
35. Linden, G.J.: Bone induction in implants of decalcified bone and dentine
J. Anat. 119, 359-367 (1975)
36. Mittelmeier, H. und B.D. Katthagen: Klinische Erfahrungen mit Collagen-Apatit-Implantationen zur lokalen Knochenregeneration
Z. Orthop. 121, 115-123 (1983)
37. Mizutani, H. und M.R. Urist: The nature of bone morphogenetic protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatine
Clin. Orthop. and Rel. Res. 171, 213-223 (1982)
38. Mosiman, R.S.: Discussion to: Osteogenetic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye
J. Bone Jt. Surg. 34-A, 470-476 (1952)
39. Mundy, G.R., J. Varani, W. Orr, M.D. Gondek, P.A. Ward: Resorbing bone is chemotactic for monocytes
Nature 275, 132-135 (1978)
40. Nogami, H. und M.R. Urist: Transmembrane bone matrix gelatine-induced differentiation of bone
Calc. Tiss. Res. 19, 153-163 (1975)

41. Obermeier, J.E.: Kritische Betrachtung über die Verwendung resorbierbarer Tamponmaterialien im zahnärztlichen Fachgebiet (Gelastypt)
Zahnärztl. Reform No. 19/20 (1955)

42. Osborn, J.F.: Hydroxylapatitkeramik - ein knochenähnlicher Biowerkstoff
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 88, 1166 (1978)

43. Osborn, J.F., E. Kovacs, A. Kallenberger: Hydroxylapatitkeramik - Entwicklung eines neuen Biowerkstoffes und erste tierexperimentelle Ergebnisse
Dtsch. zahnärztl. Z. 35, 54-56 (1980)

44. Price, P.A., A.S. Otsuka, J.W. Poser, J. Kristaponis, N. Raman: Characterisation of a γ-carboxyglutamic acid - containing protein from bone
Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 1447-1451 (1976)

45. Price, P.A., J.W. Lothringer, S.K. Nishimoto: Absence of the vitamin K-dependant bone protein in fetal rat mineral
J. of Biol. Chem. 255,7, 2938-2942 (1980)

46. Price, P.A., J.W. Lothringer, S.A. Baukol, A.H. Reddi: Developmental appearence of the vitamin K-dependant protein of bone during calcification
J. of Biol. Chem. 256,8, 3781-3784 (1981)

47. Putte, K.A. van de und M.R. Urist: Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix
Clin. Orthop. 43, 257-270 (1965)

48. Ray, R.D. und A. Holloway: Bone implants. Preliminary report of an experimental study
J. Bone Jt. Surg. 39-A, 1119-1128 (1957)

49. Ray, R.D. und T.Y. Sabet: Bone grafts: cellular survival versus induction
J. Bone Jt. Surg. 45-A, 337-344 (1963)

50. Reddi, A.H. und C.B. Huggins: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1601-1605 (1972)

51. Reddi, A.H. und C.B. Huggins: Cyclic electrochemical inactivation and restoration of competence of bone matrix to transform fibroblasts
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1648-1652 (1974)

52. Reddi, A.H. und W.A. Anderson: Collagenous bone matrix induced endochondral ossification and hemopoiesis
J. Cell Biol. 69, 557-572 (1976)

53. Schüle, H.: Die Wundheilung nach Zahnentfernung
Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 777-784 (1971)

54. Schweiberer, L.: Theoretisch experimentelle Grundlagen der autologen Spongiosatransplantation im Infekt
Unfallheilkunde 79, 151-155 (1976)

55. Sobotta, J. und F. Hammersen: Histologie; Atlas der Zytologie Histologie und der mikroskopischen Anatomie
Verlag Urban & Schwarzenberg, München (1979)

56. Späth, G.: Vergleich der osteoinduktiven Wirkung allogener und xenogener Knochenmatriximplantate
Med. Dissertation Tübingen (1981)

57. Streckbein, R.G. und C.G. Lorber: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Biokompatibilität resorbierbarer Gelatineschwämme und Trockenfibrinschaum
Dtsch. zahnärztl. Z. 33, 685-688 (1978)

58. Streckbein, R.G., I. Kraft, F.B. Kraft, C.G. Lorber: Über Antigenität und Resorptionsverhalten gebräuchlicher Gelatinepräparate und von Trockenfibrinschaum
Dtsch. zahnärztl. Z. 34, 536-540 (1979)

59. Takagi, K. und M.R. Urist: The role of bone marrow in bone morphogenetic protein induced repair of femoral massive diaphyseal defect
Clin. Orthop. and Rel. Res. 171, 224-231 (1982)

60. Takaoka, K., K. Ono, K. Amitani, R. Kishimoto, Y. Nakata: Solubilization and concentration of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma
Clin. Orthop. and Rel. Res. 148, 274-280 (1980)

61. Takaoka, K., H. Yoshikawa, N. Shimizu, K. Ono, K. Amitani, Y. Nakata: Partial purification of bone-inducing substances from a murine osteosarcoma
Clin. Orthop. and Rel. Res. 164, 265-270 (1982)

62. Thielemann, F.W., D. Veihelmann, K. Schmidt: Die Induktion der Knochenneubildung nach Transplantation
Arch. Orth. Traum. Surg. 91, 3-9 (1978)

63. Thielemann, F.W., G. Späth, D. Veihelmann, K. Schmidt: Osteoinduction part I: Test model and comperative long term observation of allogenic and xenogenic matrix implants
Arch. Orth. Traum. Surg. 99, 217-222 (1982a)

64. Thielemann, F.W., K. Schmidt, L. Koslowski: Osteoinduction part II: Purification of the osteoinductive activities of bone matrix
Arch. Orth. Traum. Surg. 100, 73-78 (1982b)

65. Thielemann, F.W., K. Schmidt, D. Veihelmann, G. Herr: Orthotope Implantation von osteogeninhaltiger Gelatine zur Defektüberbrückung
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. 151-153 (1982c)

66. Thielemann, F.W., M. Alexa, G. Herr, K. Schmidt: Matrix induced intermembraneous osteogenesis in: Silbermann, M., H.C. Slavkin (ed.) Current advances in sheltogenesis (1982d)

67. Thielemann, F.W., K. Schmidt, A.M. Feller: Ein neues Prinzip zur Behandlung größerer Knochendefekte - Experimentelles Modell und Ergebnisse
Z. Orthop. 121, 388 (1983a)

68. Thielemann, F.W., K. Schmidt, L. Koslowski: Neue Aspekte in der Behandlung größerer Knochendefekte
Act. Traumatol. 13, 115-119 (1983b)

69. Thorogood, P.V. und J.C. Gray: The cellular changes during osteogenesis in bone and bone marrow composite autografts
J. Anat. 120, 27-47 (1975)

70. Tuli, S.M. und A.D. Singh: The osteoinductive property of decalcified bone matrix
J. Bone Jt. Surg. 60-B, 116-123 (1978)

71. Urist, M.R.: The role of local transfer of bone salt in the calcification of the fracture callus
J. Bone Jt. Surg. 24,1, 47-67 (1942)

72. Urist, M.R. und F.C. McLean: Osteogenetic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye
J. Bone Jt. Surg. 34-A, 443-468 (1952)

73. Urist, M.R., B.F. Silverman, K. Buering, F.L. Dubuc, J.M. Rosenberg: The bone induction principle
Clin. Orthop. 53, 243-283 (1967)

74. Urist, M.R., T.A. Dowell, P.H. Hay, B.S. Strates: Inductive substrates for bone formation
Clin. Orthop. and Rel. Res. 59, 59-96 (1968a)

75. Urist, M.R. und T.A, Dowell: The inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix
Clin. Orthop. 61, 61-78 (1968b)

76. Urist, M.R., J.M. Jurist, F.L. Dubuc, B.S. Strates: Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits
Clin. Orthop. 68, 279-293 (1970a)

77. Urist, M.R. und B.S. Strates: Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix
Clin. Orthop. 71, 271-278 (1970b)

78. Urist, M.R.: The substratum for bone morphogenesis
Devel. Biol. Suppl. 4, 125-163 (1970c)

79. Urist, M.R.: A morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue
Calc. Tiss. Res. 4, (Suppl.), 99-101 (1970d)

80. Urist, M.R. und B.S. Strates: Bone morphogenetic protein
J. dent. Res. 50, 1392-1406 (1971)

81. Urist, M.R., H. Iwata, B.S. Strates: Bone morphogenetic protein and proteinase in the guinea pig
Clin. Orthop. 85, 275-290 (1972)

82. Urist, M.R., H. Iwata, P.L. Ceccotti, R.L. Dorfman, S.D. Boyd, R.M. McDowell, C. Chien: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatine
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3511-3515 (1973a)

83. Urist, M.R. und H. Iwata: Preservations and biodegradation of the morphogenetic property of bone matrix
J. theor. Biol. 38, 155-167 (1973b)

84. Urist, M.R., H. Iwata, S.D. Boyd, P.L. Ceccotti: Observations implicating an extracellular enzymic mechanism of control of bone morphogenesis
J. Histochem. Cytochem. 22, 88-103 (1974)

85. Urist, M.R., H. Nogami, A. Mikulski: A bone morphogenetic polypeptide
Calc. Tiss. Res. 21 (Suppl.), 81-87 (1976a)

86. Urist, M.R.: Practical applications of basic research on bone graft physiology
Instructional Course Lectures, Am. Acad. Orth. Surg., B. Evans (ed.) 25, 1-26 (1976b)

87. Urist, M.R., A.J. Mikulski, N. Nakagawa, K. Yen: A bone matrix calcificationinitiator noncollagenous protein
Am. J. Physiol. 232, (3), C 115-127 (1977)

88. Urist, M.R., A. Mikulski, A. Lietze: Solibilized and insolubilized bone morphogenetic protein
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1828-1832 (1979)

89. Urist, M.R., R.J. DeLange, G.A.M. Finerman: Bone cell differentiation and growth factors
Science 220, 680-686 (1983)

90. Urist, M.R., Y.K. Huo, A.G. Brownell, W.M. Hohl, J. Buyske, A. Lietze, P. Tempst, M. Hunkapiller, R.J. DeLange: Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 371-375 (1984)

91. Volpon, J.B., C.A.M. Xavier, R.P. Concalves: The use of decalcified granulated homologous cortical bone matrix in the correction of diaphyseal bone defects
Arch. Orth. Traum. Surg. 99, 199-207 (1982)

92. Walter, K. und C. Schütt: Alkalische Phosphatase im Serum (fortlaufende Messung)
in: Bergmeyer, H.U. (ed.): Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie, 1, 818-826 (1970)

93. Willenegger, H. und L. Hullinger: Die biologischen Vorgänge im Transplantat und -lager bei autologer, homologer und heterologer Transplantation der verschiedenen Gewebe und Organe
Langenbecks Arch. klin. Chir. 308, 955-968 (1964)

94. Winter, G.D.: Heterotopic bone formation in a synthetic sponge
Proc. Soc. Med. 63, 1111-1115 (1970)

95. Wlodarski, K., M. Ptasinska-Urbanska, S. Moskalewski, B. Jedrasiewicz: Comparison of the efficiency of bone induction by decalcified bone matrix in the mouse and rabbit
Fol. Biol. 22, 377-383 (1974)

96. Wolter, D., P. Hutzschenreuter, C. Burri: Einbaustudien autologer Spongiosa am Kompaktknochen in Abhängigkeit von der übertragenen Menge und des anliegenden Gewebes
Langenbecks Arch. Chir. Suppl., 225-228 (1974)

97. Wolter, D., P. Hutzschenreuter, C. Burri, B. Steinhardt: Einbau autologer Spongiosa am Kompaktknochen in Abhängigkeit von der Vitalität der transplantierten Zellen
Langenbecks Arch. Chir., Suppl. Chir. Forum, 383-387 (1975)

98. Yasui, N., T. Ochi, K. Takaoka, K. Ono: Osteogenesis by factor(s) isolated from mouse osteosarcoma cells in combination with collagen
Biken J. 23, 83-87 (1980)

99. Young, R.W.: Cell proliferation and specialization during enchondral osteogenesis in young rats
J. Cell Biol. 14, 357-370 (1962)

LEBENSLAUF

Michael Lehmann

17.3.1954	Geboren in Pinneberg/Holstein als Sohn von Hildegard und Hans-Joachim Lehmann
1960-1964	Besuch der Volksschule in Reinbek/Holstein
1964-1972	Besuch der Sachsenwaldoberschule in Reinbek/Holstein, Abitur
1972-1974	Soldat auf Zeit
Okt. 1974	Beginn des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
Apr. 1979	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen
27.5.1981	Abschluß des Biochemiestudiums mit dem Diplom
25.4.1986	Abschluß des Medizinstudiums mit der dritten Ärztlichen Prüfung